ACTH IRMA

Immunoradiometric Assay

For the quantitative determination of adrenocorticotropic hormone (ACTH) in human EDTA plasma

Instruction Manual

Manuel d'Instructions
Testanleitung
Manual de Instrucciones
Manuale di Istruzioni
Manual de instruções

Catalog No./REF./KAT.-NR./N° de Catálogo/
Numero di Catalogo/Nº de Catálogo: 27065, 27130

DiaSorin

Stillwater, Minnesota 55082-0285, U.S.A.

TABLE OF CONTENTS

ADRENOCORTICOTROPIC IMMUNORADIOMETRIC ASSAY

1. INTENDED USE

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE ONLY.

This kit is intended for the quantitative determination of human adrenocorticotropic hormone (ACTH) in EDTA plasma. The measurement of plasma ACTH is used in the diagnosis of adrenal dysfunctions.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

The measurement of ACTH in human plasma has been of great clinical interest for many years. In 1948 Sayers et. al. described a method for determining ACTH based on its bio-activity.[1] Since that time radioimmunoassays (RIA) measuring ACTH were developed but were based on a primary antibody which did not measure biological activity. The DiaSorin ACTH IRMA is designed to detect whole molecule ACTH (1-39). ACTH IRMA is a more sensitive method for the detection of ACTH in plasma than RIA, allowing for clearer differentiation of normal and ACTH-suppressed levels.[2]

ACTH is a secretory product of the pituitary adrenocorticotrophic cells within the anterior pituitary gland.[3] It is synthesized as part of a large 265 amino acid precursor molecule POMC (proopiomelanocortin).[5] ACTH is a 39 amino acid hormone with the following structure:

NH_2-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe-OH.

The sequence 1-13 is the same as alpha melanocyte stimulating hormone. Sequence 1-26 is considered the active portion of the molecule and is required for full biological activity.[4]

The ACTH molecule is a basic protein and labile to the action of proteolytic enzymes. It functions by increasing the synthesis and release of all adrenal corticosteroids from the adrenal cortex including cortisol, aldosterone, and the adrenal androgens. The major factors effecting ACTH release include CRH (corticotropin releasing hormone), free cortisol concentration in plasma, stress and the sleep-wake cycle. Control of ACTH concentration is mediated through a negative feedback mechanism and the central nervous system. ACTH rises in response to reductions in plasma cortisol levels. Conversely, as cortisol rises, ACTH release is inhibited at the level of the pituitary.[3]

ACTH is secreted by the pituitary gland in a pulsatile manner but follows an overriding diurnal rhythm. Levels of ACTH in the normal individual are typically highest in the early morning (6-8 A.M.) and lowest late in the day. Because of this, it is customary to perform ACTH blood draws early in the day. Conditions that have been demonstrated to upset the normal diurnal rhythm include Cushing's syndrome and ectopic ACTH syndrome as well as physiologic stress such as surgery.[6-8]

ACTH results are used in conjunction with other diagnostic assays to evaluate patients with various diseases involving the adrenal cortex. Cushing's syndrome is a metabolic disorder resulting from an increased production of cortisol by the adrenal gland. The diagnosis of Cushing's syndrome depends upon the demonstration of increased cortisol production and the lack of dexamethasone suppression. Once the diagnosis has been established, further testing is performed to determine its cause.[3,9,10] This syndrome is commonly caused by adrenal hyperplasia, secondary to pituitary ACTH overproduction. The overproduction of cortisol is due to either hypersecretion of pituitary ACTH or ectopic production of ACTH by nonendocrine tumors.

The term "Cushing's Disease" is traditionally used to define an individual who has an ACTH-producing pituitary tumor; however, it is used by some clinicians to describe anyone who has hypersecretion of pituitary ACTH regardless of the presence of a tumor.

When Cushing's syndrome is caused by excessive secretion of pituitary ACTH, elevation of ACTH may occur. The site of ACTH production in corticotroph microadenomas has been localized using the technique of bilateral inferior petrosal sinus catheterization.[11,12]

Ectopic ACTH syndrome is another possible cause of Cushing's syndrome. In these patients, non-endocrine malignant tumors produce high levels of ACTH and POMC resulting in very high cortisol production which is not subject to feedback inhibition at any
level.[13,14]
When Cushing's syndrome is due to a primary adrenal abnormality, such as an adrenal tumor, the adrenal gland acts independently of ACTH and pituitary secretion is suppressed. These patients have very low or undetectable ACTH concentrations and no response is seen with dexamethasone suppression or metyrapone stimulation tests.[3]
Adrenal insufficiency, is a condition which leads to inadequate cortisol production. It can be due to a primary inability of the adrenal to produce sufficient quantities of cortisol or secondary failure due to insufficient production of ACTH. The basal ACTH concentration of patients with primary adrenocortical insufficiency (Addison's disease) will be markedly elevated. When these patients are administered endogenous ACTH, the adrenals are unresponsive. Secondary adrenal insufficiency is caused by pituitary ACTH deficiency. Plasma ACTH levels may help to distinguish between primary and secondary adrenal insufficiency, since they are elevated in the former and reduced or absent in the latter.[3]
Nelson's syndrome is a condition caused by the development of large pituitary tumors in patients who have undergone bilateral adrenalectomy for Cushing's syndrome. ACTH levels are typically followed in these patients to help monitor clinical course and response to therapeutic regimens.[15,16]

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The DiaSorin ACTH IRMA is a highly specific and sensitive immunoradiometric assay for the measurement of human ACTH 1-39. This is accomplished using two ACTH antibodies, each one specific for different regions of the ACTH molecule. The iodinated tracer used in this system contains a purified polyclonal goat antibody specific for ACTH 26-39 and an iodine-125 labeled monoclonal antibody specific for ACTH 1-17. When samples are incubated with the tracer and mouse anti-goat coated polystyrene beads, the ACTH-specific antibodies will bind to the ACTH present in the sample. Only ACTH
1-39 present in the sample will bind to both antibodies to form an antibody complex. The unbound radioactivity is washed away and the radioactivity bound to the bead is measured. Concentrations of ACTH present in the sample are directly proportional to the radioactivity measured. Results are calculated by comparing the CPM's of each sample to the CPM's for the ACTH calibrators included with the kit.

4. REAGENTS PROVIDED IN THE KIT

ACTH IRMA Calibrator 0	1 vial/ 5.0 mL	1 vial/ 5.0 mL
ACTH IRMA Calibrators (1-5)	5 vials/ 2.0 mL	5 vials/ 2.0 mL
ACTH IRMA Beads	1 container/ 65 beads	2 containers/ 65 beads
ACTH IRMA Tracer	2 vials/ 2 mL	4 vials/ 2 mL
ACTH IRMA Wash Solution	1 vial/ 50 mL	1 vial/ 50 mL
ACTH IRMA Controls (Levels 1-3)	3 vials/ 2.0 mL	3 vials/ 2.0 mL
Number of tests	65	130

STORAGE: Upon receipt, the kit should be stored at 2-8°C. After opening, store all reagents at 2-8°, unless mentioned otherwise below, until the expiration date on the label. Reagents should not be used past the expiration date. The expiration date of the kit is reported on the external label and corresponds to the expiration date of the tracer.

When reconstituting the contents of the vials, mix gently to avoid foaming. Store all reconstituted reagents as recommended below. Reagents from different batches must not be mixed.

4.1 ACTH IRMA Calibrators (0-5): lyophilized reagent

Set of six synthetic ACTH (1-39) calibrators, at concentrations ranging from 0-1500 pg/mL, in ACTH-free human plasma with stabilizers and 0.1% sodium azide added as preservative. Exact concentration values are assigned with each lot. Calibrators are calibrated against synthetic human ACTH (1-39). The HPLC-purified synthetic human ACTH was tested and found to react equivalently to the synthetic human ACTH (1-39) obtained from the National Hormone and Pituitary Program (University of Maryland). The kit calibrators demonstrate commutability with patient samples when used with reagents and operating procedure of this *in vitro* diagnostic test as recommended. Reconstitute each vial with 2.0 mL of purified water. At room temperature, rotate calibrators for 25 - 30 minutes or let stand for 60 minutes with frequent mixing until contents are completely dissolved. Mix thoroughly before using. Store the reconstituted calibrators as follows:
For periods up to 5 days: Store at 2-8°C.
For prolonged storage (kit expiration) between use: Store at -15°C or lower.
The calibrators (including the 0 calibrator) can be frozen and thawed up to three times. Calibrators may be held at room temperature for a maximum of four 1 hour intervals during their storage at 2-8°C.

4.2 ACTH IRMA Beads: ready to use reagent

Polystyrene beads are coated with polyclonal mouse anti-goat antibody.

4.3 ^{125}I ACTH IRMA Tracer: ready to use reagent

Each vial contains 2 mL of polyclonal goat anti-ACTH and ^{125}I labeled-mouse monoclonal anti-ACTH diluted in buffered serum containing red dye and 0.1% sodium azide.

4.4 ACTH IRMA Wash Solution Concentrate: liquid solution

Contains a concentrated buffered surfactant. Prepare a working wash solution by diluting the entire vial contents to a final volume of 500 mL with distilled or deionized water.

4.5 ACTH IRMA Control, Levels 1-3: lyophilized reagent

Human plasma is spiked with the appropriate amount of synthetic human ACTH. 0.1% sodium azide and other stabilizers are added. Reconstitute each vial with 2.0 mL of purified water. At room temperature, rotate controls for 25-30 minutes or let stand with frequent mixing for 60 minutes until contents are completely dissolved. Mix thoroughly before using. Treat each control as an unknown sample. Values for each lot are printed on the control vials. Store the reconstituted controls as follows:
For periods up to 5 days: Store at 2-8°C.
For prolonged storage (kit expiration) between use: Store at -15°C or lower.
The controls can be frozen and thawed up to three times. Controls may be held at room temperature for a maximum of four 1 hour intervals during their storage at 2-8°C.

5. WARNINGS AND PRECAUTIONS

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE ONLY.
Not for internal or external use in humans or animals.

REAGENTS CONTAINING HUMAN SOURCE MATERIAL

Treat as potentially infectious.

Each serum/plasma donor unit used in the preparation of this product has been tested by a U.S. FDA approved method and found non-reactive for the presence of HBsAg, antibody to HCV and antibody to HIV 1/2. While these methods are highly accurate, they do not guarantee that all infected units will be detected. This product may also contain other human source material for which there is no approved test. Because no known test method can offer complete assurance that hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), Human Immunodeficiency Virus (HIV) or other infectious agents are absent, all products containing human source material should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions as described in the U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4th ed., May 1999 or current edition.

REAGENTS CONTAINING SODIUM AZIDE

CAUTION: Some reagents in this kit contain sodium azide. Sodium azide may react with lead or copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up. For further information, refer to "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," in the Manual Guide-Safety Management No. CDC-22 issued by the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 1976.

European Communities Hazardous Substance Risk Phrases (Council Directive 1999/45/EC)

R20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.
R32 - Contact with acids liberates very toxic gas.
S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

REAGENTS CONTAINING IODINE-125

This kit contains radioactive material which does not exceed 7.2 µCi (266 kBq) of iodine-125. Appropriate precautions and good laboratory practices should be used in the storage, handling, and disposal of this material. For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a general license: This radioactive material may be received, acquired, possessed and used only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories or hospitals, and only for *in vitro* clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the regulations and the general license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or of the state with which the Commission has entered into an agreement for the exercise of regulatory authority.

1. Storage of radioactive material should be limited to a specifically designated area.
2. Access to radioactive materials must be limited to authorized personnel only.
3. Do not pipette radioactive material by mouth.
4. Do not eat or drink within designated radioactive work areas.
5. Areas where spills may occur should be wiped up, then washed with an alkali detergent or radiological decontamination solution. Any glassware used must be rinsed completely with water before washing with other laboratory glassware.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a specific license:
The receipt, use, transfer and disposal of radioactive materials are subject to the regulations and conditions of your specific license.

WARNING: This product contains a chemical known to the State of California to cause cancer.

ATTENTION: Radioactivity printed in the package insert may be slightly different from the radioactivity printed on the box label and on the tracer vial label. The box label and the tracer vial label indicate the actual amount of radioactivity at the calibration date where the package insert indicates the theoretical radioactivity of the kit.

6. INDICATIONS OF POSSIBLE DETERIORATION OF KIT REAGENTS

6.1 A shift in the slope or position of the calibrator curve from what is normally obtained.

6.2 A decrease in maximum binding.

6.3 High nonspecific zero binding.

6.4 Poor duplicate values.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION OF PLASMA

Four hundred microliters of EDTA plasma are required to assay the specimen in duplicate in the ACTH IRMA. Heparinized samples should not be utilized in the ACTH IRMA. Grossly icteric, hemolyzed or lipemic samples should not be used.

Blood should be collected aseptically by venipuncture in a 5 or 10 mL EDTA vacutainer tube. Mix sample by gentle inversion and immediately place on crushed ice. Centrifuge sample within 30 minutes of time collected. Centrifugation should be performed for 15 minutes using approximately 1500 x g*. Immediately remove plasma from cells using a plastic pipette and transfer into a polypropylene/polystyrene tube. Store plasma samples at 2-8°C prior to assay, provided the assay can be performed within 4 hours. If the samples can not be assayed within 4 hours, samples must be stored at -20°C. Samples may be stored at 2-8°C for up to 4 hours or at –20°C for up to 6 months.

NOTE: DiaSorin studies on freshly drawn samples show an average decrease of 20-35% in ACTH concentrations after on e freeze thaw. Minimal changes were observed after three subsequent freeze thaws.

A study (n = 50) was done using siliconized versus non-siliconized tubes. The geometric mean for the silconized tubes was 28.8 pg/mL (2SD range 13.9-59.7). The geometric mean for the non-silconized tubes was 26.7 pg/mL (2SD range 12.4-57.5).

8. EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED

8.1 Disposable polypropylene or polystyrene tubes, 12 x 75 mm.

Borosilicate glass tubes may not be used.

8.2 Test tube rack.

8.3 Gamma counter capable of counting iodine-125.

8.4 Vortex mixer.

8.5 Pipetting devices:

- **a.** Micropipettor calibrated to deliver 50 µL and 200 µL.
- **b.** Repeating dispensers, calibrated to deliver 50 µL, 200 µL and 1 mL.
- **c.** Volumetric pipettes for reconstituting controls and calibrators; 2.0 mL and 5.0 mL.

8.6 500 mL graduated cylinder.

8.7 Parafilm or equivalent for covering test tubes.

8.8 Teflon-coated forceps or other device for dispensing beads.

8.9 Aspiration unit.

8.10 Purified water for component reconstitution.

9. ASSAY PROCEDURE

Allow all reagents to come to room temperature prior to use.

9.1 Reconstitution of ACTH IRMA Calibrators / Controls

- **a.** Remove lyophilized ACTH IRMA Calibrators and Controls from the refrigerator.
- **b.** Using a volumetric pipette, add 2.0 mL of purified water to ACTH IRMA Calibrators and Controls. Similarly, add 5.0 mL of deionized or distilled water to the ACTH 0 Calibrator.
- **c.** Gently tap the bottles to dislodge the lyophilized pellet and mix gently.
- **d.** At room temperature, rotate calibrators and controls for 25 - 30 minutes or let stand with frequent mixing for 60 minutes until contents are completely dissolved. Mix thoroughly before using.
- **e.** Reconstitution is complete when all solutions appear homogeneous.

* $g = (1118 \times 10^{-8})$ (radius in cm) $(\text{rpm})^2$

9.2 Preparation of ACTH IRMA Wash Solution.

The ACTH IRMA Working Wash Solution Concentrate is diluted 10X in purified water to give a working strength solution.

a. Empty the 50 mL bottle containing the Concentrate into a 500 mL graduated cylinder.

b. Following the addition, rinse the bottle contents with purified water and add the rinse of the concentrate to the 500 mL cylinder.

c. Bring the final volume of the 500 mL cylinder to 500 mL with the continued addition of purified water. Stir to ensure complete dissolution of any precipitated material and uniform mixing. Label this material ACTH IRMA Wash Working Solution.

9.3 Set up properly labeled 12 x 17 mm polypropylene/polystyrene tube, in duplicate.

Add reagents to the tubes as follows:

a. **Calibrator 0**
200 µL Calibrator 0
50 µL ^{125}I ACTH IRMA Tracer (red)

b. **Calibrators (1-5)**
200 µL Calibrator
50 µL ^{125}I ACTH IRMA Tracer (red)

c. **Controls and unknown samples**
200 µL sample
50 µL ^{125}I ACTH IRMA Tracer (red)

9.4 Vortex the rack containing all tubes three times for 1-2 seconds each. Tube con-tents should not be allowed to foam.

9.5 Dispense one ACTH IRMA bead into each tube with Teflon-coated forceps or suitable dispenser for handling beads. (Do not use fingers.)

9.6 Cover the tubes with parafilm or equivalent.

Incubate the tubes for 20 (±2) hours at 18-25°C. Record temperature at the beginning and the termination of the assay.

. Following the 20 (±2) hour incubation, the tubes are washed as outlined below:

a. Aspirate the reaction mixture into an appropriate container for radioactive waste.

b. Wash each tube with the ACTH IRMA Working Wash Solution.

Wash the bead by vigorously dispensing 1 mL of Working Wash Solution into each test tube with sufficient force to raise the bead from the bottom of the test tube. Aspirate following each wash step. Repeat the wash procedure two times for a total of three washes.

9.7 Measure the radioactivity present in each tube using a gamma counter. Tubes should be counted for 1 minute or longer (see Limitations of Procedure section).

10. PROCEDURAL COMMENTS

10.1 When adding beads to the tubes, tilt the test tube rack slightly and allow beads to roll into the tubes. This will prevent excessive splashing of the test solution. Do not handle beads with fingers.

10.2 Pipette 125I ACTH IRMA Tracer to the lower one third of the test tube.

10.3 Samples reading greater than the highest calibrator must be diluted with 0 Calibrator and re-assayed.

10.4 All patient samples MUST be kept on ice until assayed.

10.5 To obtain optimal kit performance beads must be thoroughly washed.

10.6 No assay drift was observed in assays up to 130 tubes.

10.7 In order for a laboratory to completely monitor the performance of an IRMA there are additional factors which may be checked. DiaSorin suggests a check of the following parameters to assure consistent kit performance.

a. Maximum Binding
Counts per minute (CPM) of “5” Calibrator Tube)

b. Nonspecific Binding
CPM of 0 Calibrator Tube

11. QUALITY CONTROL

Each laboratory must include at least one high and one low control in every assay, to monitor assay performance. Commercially available controls or the 3 reference controls provided with the kit may be utilized. The kit controls contain ACTH at concentrations typical of normal and elevated patient ranges. The kit controls have been assayed using the DiaSorin ACTH IRMA kit. Ranges determined by DiaSorin are printed on the control vials. The controls used should be treated as unknown specimens and assayed in duplicate. Quality control charts should be maintained by the laboratory to follow performance of the controls. Control results should be analyzed by statistical methods that adequately evaluate trends. Acceptable performance limits should be determined by the individual laboratory for each level of control using statistically based methods designed to detect both random and systematic errors. Control results must meet the laboratory’s criteria for acceptability prior to reporting patient test results.[17-19]

12. CALCULATION OF RESULTS

To determine the concentration of ACTH found in unknown and control samples, a calibrator curve is prepared with every assay using the calibrator concentrations stated on the vial labels. Values for unknowns are generated as follows:

12.1 Calculate the average CPM for each calibrator, control, and unknown sample.

12.2 Using log-linear graph paper, plot the CPM of each calibrator level on the ordinate (Y-axis) against the calibrator concentration on the abscissa (X-axis).

NOTE: Automated data reduction programs may also be utilized in the analysis of data. DiaSorin utilizes Multi-Calc (Pharmacia) with a log-CPM smooth-SPLINE fit program. Other data reduction methods must be validated before incorporating for regular use.

12.3 Interpolate the levels of ACTH in the samples from the plot.

12.4 If any unknown sample reads greater than the highest calibrator, it should be diluted with 0 calibrator and reassayed.

12.5 If an unknown sample has been diluted, correct for the appropriate dilution factor.

12.6 Values less than Calibrator 1 but greater than 1.5 pg/mL (assay sensitivity) may be estimated using the formula:

$$\text{Values of unknown} \quad \frac{\text{CPM (unknown)}}{\text{CPM (Ca1. 1)}} \quad \text{x Value of Cal. 1}$$

12.7 The reportable range of the assay falls within the concentration of the highest calibrator and assay sensitivity.

Sample Data

Typical sample data and a calibrator curve for ACTH IRMA are shown in TABLE I and Figure 1; this information is for reference only and should not be used for the calculation of any value. This data was generated with fresh tracer.

Data Reduction

The DiaSorin QC lab uses a smoothed spline curve fit.

TABLE I
DiaSorin ACTH IRMA Sample Data

Tube	Duplicate CPM	Average CPM	Conc. (pg/mL)
Calibrator 0	563	577	
	591		
Calibrators (pg/mL)			
1 (9.9)	1,562	1,627	
	1,692		
2 (23.3)	3,348	3,367	
	3,385		
3 (96.1)	11,573	11,519	
	11,464		
4 (328)	35,676	35,551	
	35,426		
5 (1330)	104,713	102,148	
	99,583		
Unknown Samples			
1	3,999	4,132	30
	4,264		
2	13,668	12,831	109
	11,993		
3	41,418	41,488	387
	41,557		

ACTH IRMA SAMPLE CALIBRATOR CURVE

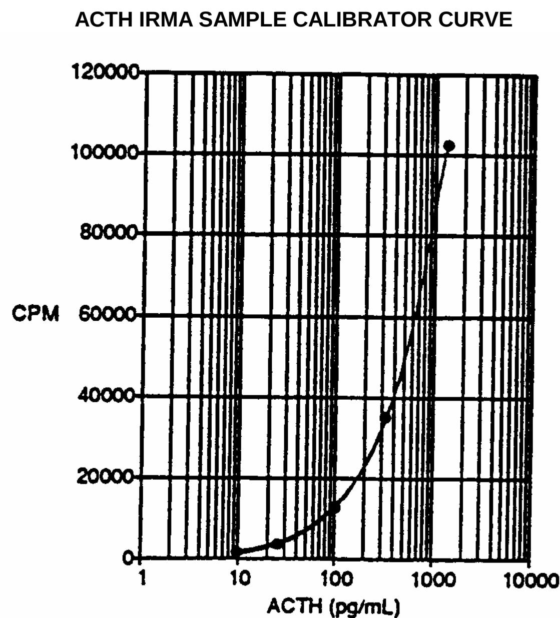


FIGURE 1

13. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

13.1 Counting times should be sufficient to reduce statistical error (for example, accumulation of 2,000 counts will yield 5% error; 10,000 counts will yield 1% error).

13.3 All ACTH results must be interpreted carefully with the overall clinical presentations and other supportive diagnostic tests.

14. EXPECTED VALUES

DiaSorin Inc. recommends that each testing laboratory establish its own reference (normal) range.

Normal Range

Each laboratory should establish its own normal range. A normal range has been established by DiaSorin using 100 frozen EDTA plasma samples from apparently healthy volunteers (50 females, 50 males). Samples were drawn in non-siliconized tubes between 7-10:00 a.m. from fasting (overnight) donors. The geometric mean was found to be 18.5 pg/mL with a 2 S.D. range of 6.0 to 56.7 pg/mL.

15. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

15.1 Precision

Within-run and total precision were determined using NCCLS Document EP5-T2. Each of three sites assayed four controls in duplicate over twelve operating days.

Within - run Precision (values = pg/mL).

Sample Number	Mean Value	S.D.	% C.V.
1	32.7	1.37	4.20
2	58.0	2.05	3.53
3	194	4.90	2.53
4	773	41.97	5.43

Total Assay Precision (values = pg/mL).
The data was combined from three sites.

Sample Number	Mean Value	S.D.	% C.V.
1	32.7	1.88	5.8
2	62.0	6.15	9.9
3	194	9.04	4.7
4	817	87.6	10.7

Low end precision was further evaluated at DiaSorin as follows:

Between - run Precision (values = pg/mL).
Each sample was assayed in 10 separate assays.

Sample Number	Mean Value	S.D.	% C.V.	n
1	8.65	0.496	5.74	10
2	10.67	0.527	4.94	10
3	257.0	8.126	3.16	10

Within - Assay Precision (values = pg/mL).
Each sample was run as 10 replicates in a single assay.

Sample Number	Mean Value	S.D.	% C.V.	n
1	8.6	0.411	4.78	10
2	10.39	0.437	4.21	10
3	260.7	9.22	3.54	10

15.2 Trueness: The assay trueness has been checked by the linearity test and the recovery test.

Linearity

Two EDTA spiked samples and one EDTA spiked pool were diluted with 0 calibrator. Results are summarized below, (values = pg/mL).

Sample Number	Dilution	Measured	Corrected for dilution
1	Undiluted	>E Cal.	
	1:2	755	1510
	1:4	.40	1360
	1:8	158	1264
	1:16	84	1344
	1:32	41	1312
	1:67	21	1344
	1:128	11	1408
2	Undiluted	1239	
	1:2	644	1287
	1:4	336	1344
	1:8	158	1264
	1:16	80	1280
	1:32	37	1184
	1:67	20	1280
	1:128	9	1152
Pool	Undiluted	>E Cal.	
	1:2	713	1426
	1:4	342	1368
	1:8	155	1240
	1:16	78	1248
	1:32	39	1248
	1:67	20	1280
	1:128	10	1380

Accuracy

Representative data from three pooled samples were spiked with ACTH 1-39 to determine the recoveries, (values = pg/mL).

Background Value	ACTH Added	Expected Value	Measured Value	Percent Recovery
Pool 1 17.4	5 25 50 75 125 500	22.4 42.4 67.4 92.4 142.4 517.4	20.4 37.6 59.8 81.1 118.5 571.7	91.1 88.7 88.7 87.8 83.2 110.5
			Avg. Recovery	91.7
Pool 2 32.1	5 25 50 75 125 500	37.1 57.1 82.1 107.1 157.1 532.1	36.2 52.3 71.1 92.8 128.3 583.0	97.6 91.6 86.6 86.6 81.7 109.6
			Avg. Recovery	92.3
Pool 3 31.2	5 25 50 75 125 500	36.2 56.2 81.2 106.2 156.2 531.2	35.5 48.9 69.0 89.6 129.7 520.6	98.1 87.0 85.0 84.4 83.0 98.0
			Avg. Recovery	87.5

15.3 Analytical Sensitivity

Sensitivity, defined as the ACTH concentration measured two standard deviations above the 0 calibrator counts, at minimum binding is 1.5 pg/mL or less, with fresh tracer.

15.4 Specificity and Cross Reactivity

The cross-reactivity of the ACTH IRMA was made with the following peptide concentrations added to both a low and medium calibrator.

Peptide	Dose (pg/mL)	Change in medium Calibrator (pg/mL)	% change	Change in low Calibrator (pg/mL)	% change
ACTH 1 - 26	100,000	-304.3	-82.9%	-35.3	-83.0%
	1,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	500	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	200	0.0	0.0%	0.0	0.0%
ACTH 18 - 24	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	50,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
ACTH 26 - 39	100,000	-358.4	-97.7%	-37.1	-87.3%
	5,000	-261.5	-71.3%	-35.0	-82.2%
	2,000	-169.4	-46.2%	-30.5	-71.6%
	1,000	-97.0	-26.4%	-21.5	-50.6%
	500	-45.0	-12.3%	-14.0	-33.0%
ACTH 1 - 10	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	50,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	1,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	500	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	200	0.0	0.0%	0.0	0.0%
α-MSH	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	1,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	500	0.0	0.0%	0.0	0.0%
β-MSH	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	50,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
β-Endorphin	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	50,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%

SEE LAST PAGE FOR REFERENCES

DOSAGE IMMUNOMETRIQUE DE L'ADRENOCORTICOTROPHINE

1. INDICATION

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*.

Cette trousse permet la détermination quantitative de l'hormone corticotrope humaine (ACTH) dans le plasma EDTA. La détermination de la ACTH dans le plasma est utilisée dans le diagnostic des troubles de la glande surrénale.

2. RÉSUMÉ ET COMMENTAIRE

La détermination de la ACTH dans le plasma humain fait preuve d'un grand intérêt clinique depuis de nombreuses années.En 1948 Sayers et. al. ont décrit une méthode de détermination de la ACTH basée sur sa bio-activité.[1] Le dosage radio-immunologique (RIA) de la ACTH s'est ensuite développé. Il était toutefois basé sur un anticorps primaire qui ne mesurait pas l'activité biologique. La trousse DiaSorin ACTH IRMA est conçue pour détecter la molécule ACTH entière (1-39). La méthode ACTH IRMA est plus sensible que la RIA pour le dosage de la ACTH dans le plasma, car elle permet de mieux différencier les taux normaux et les taux de ACTH supprimés.[2]

La ACTH est une substance sécrétée par les cellules adrénocorticotrophiques de l'hypophyse antérieure.[3] Elle est synthétisée comme une partie de sa grande molécule précurseur formée de 265 acides aminés, la POMC (pro-opiomélanocortine).[5] La ACTH est une hormone formée de 39 acides aminés. Sa structure est la suivante :

NH_2-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe-OH.

La séquence 1-13 est la même que l'hormone de stimulation alpha du mélanocyte. La séquence 1-26 est considérée comme la portion active de la molécule et est nécessaire à l'activité biologique totale.[4]

La molécule ACTH est une protéine primaire labile dans l'action des enzymes protéolytiques. Elle a pour fonction d'augmenter la synthèse et la sécrétion de tous les corticostéroïdes hypophysaires du cortex surrénal, y compris le cortisol, l'aldostérone et les androgènes adrénaux. Les facteurs principaux agissant sur la sécrétion de la ACTH sont la CRH (substance libératrice de l'hormone corticotrope), la concentration de cortisol libre dans le plasma, le stress et le cycle sommeil-réveil. La concentration de ACTH est contrôlée par un mécanisme de suivi négatif et par le système nerveux central. La ACTH augmente en fonction de la baisse du cortisol dans le plasma. Inversement, lorsque le cortisol augmente, la sécrétion de ACTH est inhibée au niveau de l'hypophyse.[3]

La ACTH est sécrétée par l'hypophyse de manière pulsatile, mais elle suit essentiellement un rythme diurne. Les taux de ACTH chez un individu normal est généralement plus élevé tôt le matin (6-8h) et plus bas en fin de journée. Les prélèvements de sang pour le dosage de la ACTH sont donc généralement effectués le matin. Parmi les éléments modifiant le rythme journalier normal figurent le syndrome de Cushing et le syndrome de la ACTH ectopique, ainsi qu'un stress physiologique comme une intervention chirurgicale.[6-8]

Les résultats du dosage de la ACTH sont utilisés avec d'autres examens diagnostiques pour évaluer les patients présentant différentes maladies atteignant le cortex surrénal. Le syndrome de Cushing est un trouble métabolique provoqué par l'hypersécrétion de cortisol par le cortex surrénal. Le diagnostic du syndrome de Cushing se base sur la démonstration d'une hypersécrétion de cortisol et d'un manque de suppression du dexaméthasone. Lorsque le diagnostic est établi, d'autres examens sont effectués pour en déterminer la cause.[3,9,10] Ce syndrome est généralement causé par l'hyperplasie surrénale provoquée par l'hypersécrétion de ACTH par l'hypophyse. L'hypersécrétion de cortisol est provoquée soit par l'hypersécrétion de ACTH de la part de l'hypophyse, soit par la production ectopique de ACTH par des tumeurs non endocrines.

Le terme « maladie de Cushing » est traditionnellement employé pour définir un individu atteint de tumeur hypophysaire produisant de la ACTH ; il est également utilisé par certains médecins pour décrire une personne présentant une hypersécrétion de ACTH par l'hypophyse même en l'absence de tumeur.

Lorsque le syndrome de Cushing est provoqué par une sécrétion excessive de ACTH par l'hypophyse, le taux de ACTH peut augmenter. Le site de production de ACTH dans les micro-adénomes corticotropes a été localisé à l'aide d'une technique de cathétérisation bilatérale inférieure du sinus pétreux.[11,12]

Le syndrome de la ACTH ectopique constitue une autre cause possible du syndrome de Cushing. Chez ces patients, les tumeurs malignes non endocrines produisent un taux de ACTH et de POMC provoquant une sécrétion très élevée de cortisol qui n'est sujette à aucune inhibition suivie, à quelque
niveau que ce soit.[13,14]

Lorsque le syndrome de Cushing est dû à un trouble surrénal primaire, comme la tumeur surrénale, la glande surrénale agit indépendamment de la ACTH. La sécrétion hypophysaire est alors supprimée. Ces patients présentent des concentrations de ACTH très faibles, voire indétectables, et ne répondent pas à la suppression de dexaméthasone ou aux tests de stimulation à la métyrapone.[3]

L'insuffisance surrénale provoque une production de cortisol inadaptée. Elle peut être provoquée par une incapacité primaire de la glande surrénale à produire une quantité suffisante de cortisol ou un à échec secondaire dû à la sécrétion insuffisante de ACTH. La concentration basique de ACTH chez les patients atteints d'insuffisance surrénale (maladie d'Addison) sera très élevée. Lorsque ces patients sont soumis à un traitement par ACTH endogène, la glande surrénale ne répond pas. L'insuffisance surrénale secondaire est causée par une déficience de la ACTH hypophysaire. Le taux de ACTH dans le plasma peut aider à établir si l'insuffisance surrénale est primaire ou secondaire, car il est élevé dans le premier cas et réduit ou absent dans le second.[3]

Le syndrome de Nelson est provoqué par le développement de tumeurs hypophysaires importantes chez les patients ayant subi une surrénalectomie bilatérale pour traiter le syndrome de Cushing. Le taux de ACTH est généralement suivi chez ces patients dans le but de surveiller l'évolution clinique et la réponse aux régimes thérapeutiques.[15,16]

3. DESCRIPTION DE LA METHODE DE DOSAGE

Le dosage IRMA DiaSorin ACTH est un dosage immunométrique très spécifique et sensible pour la détermination quantitative de la ACTH humaine 1-39. Il emploie deux anticorps ACTH, chacun d'entre eux étant spécifique à un endroit de la molécule ACTH. Le traceur iodé employé dans ce système contient un anticorps de chèvre polyclonal purifié spécifique à la ACTH 26-39 et un anticorps monoclonal marqué par de l'iode-125 spécifique à la ACTH 1-17. Lorsque les échantillons sont incubés avec le traceur et des billes de polystyrène enduites d'anticorps anti-chèvre de souris, les anticorps spécifiques à la ACTH se lient à la ACTH présente dans l'échantillon. Seule la ACTH 1-39 présente dans l'échantillon se liera aux deux anticorps, pour former un complexe d'anticorps. La radioactivité non liée est lavée et la radioactivité liée à la bille est mesurée. La concentration de ACTH présente dans l'échantillon est directement proportionnelle à la radioactivité mesurée. Les résultats sont calculés en comparant les CPM de chaque échantillon aux CPM des étalons ACTH fournis dans la trousse.

4. RÉACTIFS FOURNIS DANS LA TROUSSE

Etalon 0 ACTH IRMA Etalons ACTH IRMA (1-5) Billes ACTH IRMA Traceur ACTH IRMA Solution de lavage ACTH IRMA Contrôles ACTH IRMA (niveaux 1-3)	1 flacon / 5,0 mL 5 flacons / 2,0 mL 1 récipient / 65 billes 2 flacons / 2 mL 1 flacon / 50 mL 3 flacons / 2,0 mL	1 flacon / 5,0 mL 5 flacons / 2,0 mL 2 récipients / 65 billes 4 flacons / 2 mL 1 flacon / 50 mL 3 flacons / 2,0 mL
Nombre de dosages	65	130

CONSERVATION : Dès réception, la trousse doit être stockée entre 2 et 8 °C. Après l'ouverture, conserver tous les réactifs à une température comprise entre 2 et 8°, sauf indication différente ci-dessous, jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Les réactifs ne doivent pas être utilisés au-delà de la date de péremption. La date de péremption de la trousse se trouve sur l'étiquette extérieure et correspond à celle du traceur.

Pendant la reconstitution du contenu des tubes, agiter délicatement pour éviter la formation de mousse. Conserver tous les réactifs reconstitués comme indiqué ci-dessous. Les réactifs de lots différents ne doivent pas être mélangés.

4.1 Etalons ACTH IRMA (0-5) : réactif lyophilisé

Jeu de six étalons ACTH (1-39) synthétiques, à des concentrations de 0 à 1500 pg/mL, dans du plasma humain exempt de ACTH avec des stabilisateurs et 0,1% de nitrure de sodium comme conservateur. Les valeurs exactes de ces concentrations sont fournies avec chaque lot. Les étalons sont calibrés pour la ACTH humaine synthétique (1-39). La ACTH humaine synthétique purifiée par HPLC a été testée. Elle réagit de manière équivalente à la ACTH (1-39) humaine synthétique dans l'étude du National Hormone and Pituitary Program (Université du Maryland). Les étalons de la trousse démontrent leur commutabilité avec les échantillons des patients lorsqu'ils sont utilisés avec des réactifs et selon le mode d'emploi de ce dosage diagnostique *in vitro*, comme recommandé. Reconstituez chaque flacon avec 2,0 mL d'eau purifiée. A température ambiante, faites tourner les étalons pendant 25 à 30 minutes ou laissez-les reposer pendant 60 minutes en les mélangeant fréquemment, jusqu'à ce que le contenu soit entièrement dissout. Mélangez vigoureusement avant l'emploi. Conservez les étalons reconstitués de la manière suivante :

Jusqu'à 5 jours : conservez à 2-8°C.

Pour une conservation prolongée (jusqu'à la date de péremption de la trousse) entre les utilisations : conservez à -15°C ou moins.

Ces étalons (à l'exception de l'étalon 0) peuvent être congelés et décongelés trois fois. Les étalons peuvent être maintenus à température ambiante pendant un intervalle d'une heure maximum durant leur conservation à 2-8°C.

4.2 Billes ACTH IRMA : réactif prêt à l'emploi

Les billes de polystyrène sont enduites d'anticorps polyclonal de souris anti-chèvre.

4.3 Traceur I^{125} ACTH IRMA : réactif prêt à l'emploi

Chaque flacon contient 2 mL d'anticorps polyclonal de chèvre anti-ACTH et d'anticorps monoclonal de souris anti-ACTH marqué par l'iode ^{125}, dilués dans un tampon de sérum contenant un colorant rouge et 0,1% de nitrure de sodium.

4.4 Solution de lavage concentrée ACTH IRMA : solution liquide

Contient une solution concentrée d'agent de surface tamponné. Préparez une solution de lavage en diluant tout le contenu du flacon avec de l'eau distillée ou désionisée jusqu'à obtenir un volume total de 500 mL.

4.5 Contrôles ACTH IRMA, Degrés 1-3 : réactif lyophilisé

Le plasma humain est dopé à l'aide d'une quantité appropriée de ACTH humaine synthétique. 0,1% de nitrure de sodium et d'autres stabilisateurs sont ajoutés. Reconstituez chaque flacon avec 2,0 mL d'eau purifiée. A température ambiante, faites tourner les étalons pendant 25 à 30 minutes ou laissez-les reposer pendant 60 minutes en les mélangeant fréquemment, jusqu'à ce que le contenu soit entièrement dissout. Mélangez vigoureusement avant l'emploi. Traitez chaque contrôle comme un échantillon à déterminer. Les valeurs définies pour chaque lot figurent sur l'étiquette des flacons du sérum de contrôle. Conservez les contrôles reconstitués de la manière suivante :

Jusqu'à 5 jours : conservez à 2-8°C.

Pour une conservation prolongée (jusqu'à la date de péremption de la trousse) entre les utilisations : conservez à -15°C ou moins.

Ces contrôles peuvent être congelés et décongelés trois fois. Les contrôles peuvent être maintenus à température ambiante pendant un intervalle d'une heure maximum durant leur conservation à 2-8°C.

5. AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*.

Non prévu pour une utilisation interne ou externe sur l'homme ou l'animal.

REACTIFS CONTENANT DES PRODUITS D'ORIGINE HUMAINE

Traiter comme potentiellement infectieux.

Chaque don de sérum/plasma intervenant dans la préparation de ce produit a été testé par une méthode agréée par la FDA et s'est avéré non réactif en présence de HBsAG, d'anticorps anti-VHC et d'anticorps anti-VIH1/2. Même si ces méthodes sont extrêmement précises, elles ne garantissent pas la détection de tous les dons infectés. Ce produit peut également contenir d'autres produits d'origine humaine pour lesquelles il n'existe aucun test agréé. Comme aucune méthode de test connue ne peut offrir l'assurance complète de l'absence du virus de l'hépatite B (HBV) de l'hépatite C (HCV), du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou d'autres agents infectieux, tous les produits d'origine humaine doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire en prenant les précautions appropriées décrites dans le document U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, “Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories,” 4ème éd., mai 1999 ou dernière édition.

REACTIFS CONTENANT DU NITRURE DE SODIUM

ATTENTION : Certains réactifs de cette trousse contiennent du nitrure de sodium. Le nitrure de sodium peut réagir avec la plomberie en plomb ou en cuivre et former des azotures ultra-explosifs. Pour leur mise au rebut, rincer à grande eau pour empêcher l'accumulation de nitrure. Pour plus d'informations, consulter « Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts », dans le manuel Guide-Safety Management No. CDC-22 publié par les Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA,.

Déclaration des risques relatifs aux substances dangereuses des communautés européennes (Directive du conseil 1999/45/EC)

R 20/21/22 - Nocif en cas d'inhalation, d'ingestion et de contact avec la peau.

R 32 - Un contact avec les acides dégage des gaz très toxiques.

S28 - Après un contact avec la peau, laver immédiatement à grande eau.

RÉACTIFS CONTENANT DE L'IODE 125

Cette trousse contient un produit radioactif qui ne dépasse pas 7,2 µCi (266 kBq) d'iode-125. Les précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être utilisées pour la conservation, la manipulation et la mise au rebut de ce produit. Pour les praticiens ou institutions recevant les radio-isotopes sous une licence générale : ce produit radioactif peut être reçu, acheté, détenu et utilisé uniquement par des médecins, des vétérinaires pratiquant la médecine vétérinaire, des laboratoires cliniques et des

hôpitaux, uniquement pour des analyses cliniques ou de laboratoires *in vitro* n'impliquant pas l'administration interne ou externe du produit, ni par rayonnement, à l'homme ou à l'animal. Sa réception, son acquisition, sa détention, son utilisation et son transfert sont sujets aux réglementations et à la licence générale de l'U.S. Nuclear Regulatory Commission de l'État avec lequel la Commission a conclu un accord pour l'exercice de l'autorité réglementaire.

1. Le produit radioactif doit être conservé dans son récipient d'origine à un endroit désigné.
2. L'accès aux produits radioactifs doit être limité au personnel autorisé uniquement.
3. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
4. Ne pas manger, ni boire dans les zones de travail radioactives.
5. En cas de déversement de produits radioactifs dans une zone, nettoyer la zone, puis la laver à l'aide d'un produit détergent à base d'alcali ou d'une solution de décontamination radioactive. Tout article de verre utilisé doit être entièrement lavé à l'eau avant de laver les autres articles de verre du laboratoire.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence spécifique :
La réception, l'utilisation, le transfert et la mise au rebut de produits radioactifs sont sujets aux réglementations et conditions de votre licence spécifique.
Avertissement : Ce produit contient un produit chimique connu dans l'Etat de Californie comme étant cancérigène.

ATTENTION : La radioactivité imprimée sur la notice d'utilisation peut être légèrement différente de celle qui est imprimée sur l'étiquette de la boîte et sur l'étiquette du flacon du traceur. Les étiquettes de la boîte et du flacon du traceur indiquent la dose réelle de radioactivité à la date de calibrage, alors que la notice d'utilisation indique la radioactivité théorique de la trousse.

6. INDICATIONS D'UNE DÉTÉRIORATION POSSIBLE DES RÉACTIFS DE LA TROUSSE

6.1 Écart de pente ou de position de la courbe d'étalonnage par rapport à la normale obtenue.

6.2 Diminution de la liaison maximale.

6.3 Haute liaison nulle non spécifique.

6.4 Doublets faibles.

7. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DU PLASMA

Quatre cents microlitres de plasma EDTA, en doublet, sont nécessaires dans le dosage ACTH IRMA. Ne pas utiliser d'échantillons héparinisés dans le dosage ACTH IRMA. Les échantillons fortement ictériques, hémolysés ou lipémiques doivent être évités.

Le sang doit être prélevé de manière aseptique par ponction veineuse dans un tube de verre à vide de 5 ou 10 ml d'EDTA. Mélangez l'échantillon en inversant soigneusement et placez immédiatement dans de la glace pilée. Centrifugez l'échantillon dans les 30 minutes suivant le prélèvement. Centrifugez pendant 15 minutes à environ 1500 x g*. Retirez immédiatement le plasma des cellules à l'aide d'une pipette de plastique et disposez-le dans un tube de polypropylène ou de polystyrène. Conservez les échantillons de plasma à 2-8°C avant le dosage si celui-ci peut être effectué dans un délai de 4 heures. Si le dosage ne peut être effectué dans les quatre heures, conservez-le à -20°C. Les échantillons peuvent être conservés à une température comprise entre 2 et 8°C jusqu'à 4 heures ou à –20°C pendant 6 mois.

REMARQUE : les études de DiaSorin sur les échantillons frais montrent une chute moyenne de 20 à 35% dans les concentrations de ACTH effectuées après congélation et décongélation. Des variations minimums ont été observées après trois congélations et décongélations successives.

* g = (1118×10^{-8}) (rayon en cm) $(rpm)^2$

Une étude (n = 50) a été conduite dans des tubes siliconés et non siliconés. La moyenne calculée pour les tubes siliconés était de 28,8 pg/mL (2SD intervalle 13,9-59,7). La moyenne calculée pour les tubes non siliconés était de 26,7 pg/mL (2SD intervalle 12,4-57,5).

8. MATÉRIEL ET PRODUITS REQUIS MAIS NON FOURNIS

8.1 Tubes à essai de polypropylène ou polystyrène jetables 12 x 75 mm.

Ne pas utiliser de tubes de verre borosilicaté.

8.2 Portoir.

8.3 Compteur gamma capable de compter l'iode 125.

8.4 Agitateur-mélangeur vortex.

8.5 Pipettes :

- **a.** Micropipette calibrée pour dispenser 50 µL et 200 µL.
- **b.** Pipettes à répétition calibrées pour dispenser 50 µL, 200 µL et 1 mL.
- **c.** Pipettes volumétriques pour la reconstitution des contrôles et des étalons ; 2,0 mL et 5,0 mL.

8.6 Cylindre gradué de 500 mL.

8.7 Parafilm ou équivalent pour couvrir les tubes.

8.8 Pinces recouvertes de Téflon ou tout autre dispositif agréé pour la manipulation des billes.

8.9 Aspirateur.

8.10 Eau purifiée pour la reconstitution des composants.

9. PROCÉDURE DE DOSAGE

Laissez tous les réactifs atteindre la température ambiante avant l'emploi.

9.1 Reconstitution des étalons / contrôles ACTH IRMA

- **a.** Retirez les étalons et contrôles ACTH IRMA lyophilisés du réfrigérateur.
- **b.** A l'aide d'une pipette volumétrique, ajoutez 2,0 mL d'eau purifiée aux étalons et contrôles ACTH IRMA. De la même façon, ajoutez 5,0 mL d'eau désionisée ou distillée à l'étalon 0 ACTH.
- **c.** Fermez soigneusement les flacons pour libérer la pastille lyophilisée et mélangez avec soin.
- **d.** A température ambiante, faites tourner les étalons pendant 25 à 30 minutes ou laissez-les reposer pendant 60 minutes en les mélangeant fréquemment, jusqu'à ce que le contenu soit entièrement dissout. Mélangez vigoureusement avant l'emploi.
- **e.** La reconstitution est complète quand toutes les solutions sont homogènes.

9.2 Préparation de la solution de lavage ACTH IRMA.

La solution de lavage concentrée ACTH IRMA est diluée 10 fois dans de l'eau purifiée pour obtenir une solution efficace.

- **a.** Videz la bouteille de 50 mL contenant le concentré dans un cylindre gradué de 500 mL.
- **b.** Après l'addition, rincez le contenu de la bouteille à l'eau purifiée et ajoutez l'eau de rinçage du concentré dans le cylindre de 500 mL.
- **c.** Portez le volume final du cylindre de 500 mL à 500 mL en ajoutant de l'eau purifiée. Agitez de manière à bien dissoudre le matériel précipité et à obtenir un mélange homogène. Marquez ce matériel Solution de lavage ACTH IRMA.

9.3 Placez en double les tubes de polypropylène/polystyrène 12 x 17 mm dûment marqués.

Ajouter les réactifs dans les tubes comme suit :

a. Etalon 0
200 µL d'étalon 0
50 µL de traceur I^{125} ACTH IRMA (rouge)

b. Etalons (1-5)
200 µL d'étalon
50 µL de traceur I^{125} ACTH IRMA (rouge)

c. Contrôles et échantillons à déterminer
200 µL d'échantillon
50 µL de traceur I^{125} ACTH IRMA (rouge)

9.4 Mélangez trois fois pendant 1 à 2 secondes le portoir contenant tous les tubes sur le Vortex. Le contenu des tubes ne doit pas mousser.

9.5 Déposez une bille ACTH IRMA dans chaque tube à l'aide de pinces recouvertes de Téflon ou tout autre dispositif approprié. (Ne pas utiliser les doigts).

9.6 Couvrez les tubes à l'aide d'un parafilm ou équivalent.

Laissez incuber les tubes pendant 20 (±2) heures à 18-25°C. Enregistrez la température au début et à la fin du dosage.

. Après l'incubation de 20 (±2) heures, lavez les tubes selon les indications suivantes :

a. Aspirez le mélange de réaction dans un récipient prévu pour le traitement des déchets radioactifs.

b. Lavez chaque tube avec la solution de lavage ACTH IRMA.

Lavez la bille en dispensant énergiquement 1 mL de solution de lavage dans chaque tube à essai, de manière à détacher la bille du fond du tube. Aspirez après chaque étape de lavage. Répétez deux fois la procédure de lavage de manière à avoir effectué trois lavages.

9.7 Mesurez la radioactivité de chaque tube à l'aide d'un compteur gamma. Les tubes doivent être comptés pendant au moins 1 minute (consultez la section Limites du dosage).

10. COMMENTAIRES SUR LA PROCÉDURE

10.1 Lors de l'ajout des billes dans les tubes, incliner légèrement le portoir et laisser les billes rouler au fond du tube. On évitera ainsi les éclaboussures de la solution à doser. Ne pas manipuler les billes avec les doigts.

10.2 Pipetez le traceur 125I ACTH IRMA dans le tiers inférieur du tube à essais.

10.3 Si un échantillon à déterminer est supérieur à l'étalon le plus élevé, il doit être dilué avec l'étalon 0 et dosé à nouveau.

10.4 Tous les échantillons des patients DOIVENT être maintenus dans la glace jusqu'au dosage.

10.5 Pour obtenir les meilleurs résultats possibles avec cette trousse, les billes doivent être bien lavées.

10.6 Aucune dérivation de dosage n'a été observée dans les dosages allant jusqu'à 130 tubes.

10.7 Pour qu'un laboratoire puisse surveiller entièrement la constance des performances d'un dosage IRMA, certains facteurs supplémentaires doivent être vérifiés. DiaSorin suggère de vérifier les paramètres suivants afin d'assurer la constance des performances de la trousse.

a. Liaison maximale
Coups par minute (CPM) du tube d'étalonnage “5”

b. Liaison non spécifique
CPM du tube d'étalonnage 0

11. CONTRÔLE QUALITÉ

Chaque laboratoire doit inclure au moins un contrôle de haut niveau et un contrôle de bas niveau à chaque dosage pour surveiller la précision du dosage. Des contrôles disponibles dans le commerce ou les trois contrôles de référence fournis avec la trousse peuvent être utilisés. Les contrôles de la trousse contiennent de la ACTH à des concentrations typiques des intervalles de patients normaux et élevés. Les contrôles de la trousse ont été évalués par DiaSorin avec la trousse ACTH IRMA125. Les intervalles déterminés par DiaSorin apparaissent sur les étiquettes des flacons. Les contrôles utilisés doivent être traités comme des échantillons à déterminer et dosés en doublets. Les graphiques de contrôle de la qualité doivent être maintenus par le laboratoire pour suivre les performances des contrôles. Les résultats de contrôle doivent être analysés selon des méthodes statistiques évaluant de manière adéquate les tendances. Les limites acceptables de performance doivent être déterminées par chaque laboratoire pour chaque niveau de contrôle d'après des méthodes statistiques conçues pour dépister les erreurs systématiques et aléatoires. Les résultats de contrôle doivent être conformes aux critères d'acceptabilité du laboratoire avant d'être validés en tant que résultats.[17-19]

12. CALCUL DES RÉSULTATS

Pour déterminer la concentration de ACTH dans les échantillons à déterminer et les échantillons de contrôle, on prépare une courbe d'étalonnage en se servant des concentrations des étalons inscrites sur les étiquettes des flacons. Les valeurs des échantillons à déterminer sont obtenues comme suit :

12.1 Calculez la moyenne de CPM pour chaque étalon, contrôle et échantillon à déterminer.

12.2 Sur une feuille de papier quadrillé logarithmique linéaire, reportez les CPM de chaque niveau d'étalon sur les ordonnées (axe des Y) et la concentration de l'étalon sur les abscisses (axe des X).

REMARQUE : Des programmes de réduction automatique des données peuvent également être utilisés pour l'analyse des données. DiaSorin utilise Multi-Calc (Pharmacia) avec un programme « log-CPM smooth-SPLINE ». D'autres méthodes de réduction des données doivent être validées avant l'incorporation pour une utilisation régulière.

12.3 Interpolez le taux de ACTH dans les échantillons d'après le tracé.

12.4 Si un échantillon à déterminer est supérieur à l'étalon le plus élevé, il doit être dilué avec l'étalon 0 et dosé à nouveau.

12.5 Inconnu a été dilué, corrigez-le en fonction du facteur de dilution approprié.

12.6 Les valeurs inférieures à l'étalon 1, mais supérieures à 1,5 pg/mL (sensibilité du dosage) peuvent être calculées à partir de la formule suivante :

$$\text{Valeurs de l'inconnu} \frac{\text{CPM (à déterminer)}}{\text{CPM (Et 1. 1)}} \times \text{Valeur de l'étalon 1}$$

12.7 L'intervalle du dosage pouvant être reporté est compris entre la concentration de l'étalon le plus élevé et la sensibilité du dosage.

Données d'échantillon

Des données d'échantillons typiques et une courbe d'étalonnage de ACTH IRMA sont présentées au Tableau I et à la FIGURE I ; ces informations sont fournies à titre de référence seulement et ne doivent pas être utilisées pour le calcul d'une valeur quelconque. Ces données ont été générées à l'aide d'un traceur frais.

Réduction des données

Le laboratoire QC DiaSorin utilise un programme « smoothed spline curve ».

TABLEAU I

Données d'échantillon DiaSorin ACTH IRMA

Tube	Double CPM	Moyenne CPM	Conc. (pg/mL)
Etalon 0	563	577	
	591		
Etalons (pg/mL)			
1 (9.9)	1,562	1,627	
	1,692		
2 (23.3)	3,348	3,367	
	3,385		
3 (96.1)	11,573	11,519	
	11,464		
4 (328)	35,676	35,551	
	35,426		
5 (1330)	104,713	102,148	
	99,583		
Échantillons à déterminer			
1	3,999	4,132	30
	4,264		
2	13,668	12,831	109
	11,993		
3	41,418	41,488	387
	41,557		

COURBE D'ETALONNAGE DE L'ECHANTILLON ACTH IRMA

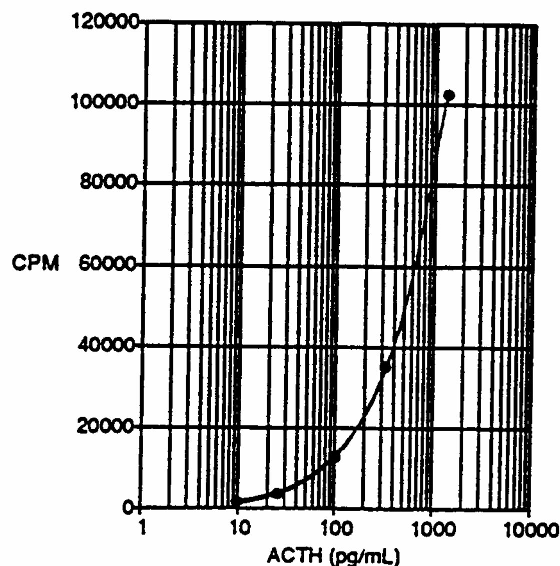


Figure 1

13. LIMITES DU DOSAGE

13.1 Les temps de numération doivent être suffisants pour réduire l'erreur statistique (par exemple, l'accumulation de 2 000 CPM donnera une erreur de 5 % ; 10 000 CPM donneront une erreur de 1 %).

13.3 Tous les résultats ACTH doivent être interprétés avec précaution, en prenant en considération les présentations cliniques générales et d'autres examens diagnostiques comme support.

14. VALEURS DE REFERENCE

DiaSorin Inc. recommande à chaque laboratoire d'examens d'établir ses propres valeurs de référence.

VALEURS NORMALES

Chaque laboratoire doit établir sa propre plage de valeurs de référence. DiaSorin a établi un intervalle normal à l'aide de 100 échantillons de plasma EDTA congelés prélevés chez des volontaires visiblement sains (50 femmes, 50 hommes). Les échantillons ont été placés dans des tubes non siliconés entre 7h00 et 10h00 de volontaires à jeun (pendant une nuit). La moyenne calculée était de 18,5 pg/mL avec un intervalle de 2 écarts-type de 6,0 à 56,7 pg/mL.

15. CRITERES DE QUALITE

15.1 Précision

La précision en cours de dosage et la précision totale ont été déterminées selon le document NCCLS EP5-T2. Chacun des trois sites ont dosé quatre contrôles en double durant douze jours de travail.

Précision en cours de dosage (valeurs = pg/mL).

Numéro d'échantillon	Valeur moyenne	Ecart-type	% C.V.
1	32.7	1.37	4.20
2	58.0	2.05	3.53
3	194	4.90	2.53
4	773	41.97	5.43

Précision totale du dosage (valeurs = pg/mL).
Les données des trois sites ont été comparées.

Numéro d'échantillon	Valeur moyenne	Ecart-type	% C.V.
1	32.7	1.88	5.8
2	62.0	6.15	9.9
3	194	9.04	4.7
4	817	87.6	10.7

DiaSorin a évalué la précision finale de la manière suivante :

Précision en cours de dosage (valeurs = pg/mL).
Chaque échantillon a été dosé dans 10 dosages différents.

Numéro d'échantillon	Valeur moyenne	Ecart-type	% C.V.	n
1	8.65	0.496	5.74	10
2	10.67	0.527	4.94	10
3	257.0	8.126	3.16	10

Précision en cours de dosage (valeurs = pg/mL).
Chaque échantillon a été dosé dans 10 rípliqués dans un seul dosage.

Numéro d'échantillon	Valeur moyenne	Ecart-type	% C.V.	n
1	8.6	0.411	4.78	10
2	10.39	0.437	4.21	10
3	260.7	9.22	3.54	10

15.2 Exactitude : l'exactitude du dosage a été vérifiée par le test de linéarité et de récupération.

Linéarité

Deux échantillons dopés EDTA et un ensemble dopé EDTA ont été dilués avec l'étalon 0. Les résultats sont résumés ci-dessous (valeurs = pg/mL).

Numéro d'échantillon	Dilution	Mesuré	Valeur corrigée
1	Non dilué	>E Eta.	
	1:2	755	1510
	1:4	.40	1360
	1:8	158	1264
	1:16	84	1344
	1:32	41	1312
	1:67	21	1344
	1:128	11	1408
2	Non dilué	1239	
	1:2	644	1287
	1:4	336	1344
	1:8	158	1264
	1:16	80	1280
	1:32	37	1184
	1:67	20	1280
	1:128	9	1152
Ensemble	Non dilué	>E Eta.	
	1:2	713	1426
	1:4	342	1368
	1:8	155	1240
	1:16	78	1248
	1:32	39	1248
	1:67	20	1280
	1:128	10	1380

Exactitude

Les données pouvant être représentées des trois échantillons ont été dopées avec de la ACTH 1-39 pour déterminer les récupérations (valeurs = pg/mL).

Valeur de référence	ACTH ajoutée	Valeur attendue	Valeur mesurée	Pourcentage de récupération
Ensemble 1 17.4	5 25 50 75 125 500	22.4 42.4 67.4 92.4 142.4 517.4	20.4 37.6 59.8 81.1 118.5 571.7	91.1 88.7 88.7 87.8 83.2 110.5
			Moy. Récupération	91.7
Ensemble 2 32.1	5 25 50 75 125 500	37.1 57.1 82.1 107.1 157.1 532.1	36.2 52.3 71.1 92.8 128.3 583.0	97.6 91.6 86.6 86.6 81.7 109.6
			Moy. Récupération	92.3
Ensemble 3 31.2	5 25 50 75 125 500	36.2 56.2 81.2 106.2 156.2 531.2	35.5 48.9 69.0 89.6 129.7 520.6	98.1 87.0 85.0 84.4 83.0 98.0
			Moy. Récupération	87.5

15.3 Sensibilité analytique

La sensibilité, définie comme la concentration de ACTH, a mesuré deux déviations standard au-dessus du compte de l'étalon 0. La liaison minimum est de 1,5 pg/mL ou moins, en utilisant un traceur frais.

15.4 Specificite et réaction croisée

La réaction croisée de ACTH IRMA a été effectuée avec les concentrations suivantes de peptides ajoutés à l'étalon bas et à l'étalon moyen.

Peptide	Dose (pg/mL)	Changement dans l'étalon moyen (pg/mL)	% change-ment	Changement dans l'étalon bas (pg/mL)	% change-ment
ACTH 1 - 26	100,000	-304.3	-82.9%	-35.3	-83.0%
	1,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	500	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	200	0.0	0.0%	0.0	0.0%
ACTH 18 - 24	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	50,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
ACTH 26 - 39	100,000	-358.4	-97.7%	-37.1	-87.3%
	5,000	-261.5	-71.3%	-35.0	-82.2%
	2,000	-169.4	-46.2%	-30.5	-71.6%
	1,000	-97.0	-26.4%	-21.5	-50.6%
	500	-45.0	-12.3%	-14.0	-33.0%
ACTH 1 - 10	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	50,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	1,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	500	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	200	0.0	0.0%	0.0	0.0%
α-MSH	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	1,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	500	0.0	0.0%	0.0	0.0%
β-MSH	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	50,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
β-Endorphine	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	50,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%

CONSULTER LA DERNIERE PAGE POUR LES REFERENCES

IMMUNORADIOMETRISCHER ACTH-ASSAY

1. VERWENDUNGSZWECK

NUR ZUR *IN-VITRO*-DIAGNOSTIK

Dieser Kit dient der quantitativen Bestimmung von humanem adrenocorticotropem Hormon (ACTH) in EDTA-Plasma. Die Messung von Plasma-ACTH wird für die Diagnose von Nebennierenfunktionsstörungen verwendet.

2. ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Die Messung von ACTH in humanem Plasma war viele Jahre lang von großem klinischen Interesse. Im Jahr 1948 beschrieben Sayers et. al. ein Verfahren zur Bestimmung von ACTH auf der Grundlage seiner Bioaktivität.[1] Seitdem wurden Radioimmunoassays (RIA) zur Messung von ACTH entwickelt; sie basierten jedoch auf einem primären Antikörper, mit dem die biologische Aktivität nicht gemessen werden konnte. Mit dem DiaSorin ACTH IRMA kann das gesamte ACTH-Molekül detektiert werden (1-39). Der ACTH IRMA ist ein empfindlicheres Verfahren zur Detektion von ACTH im Plasma als ein RIA; er ermöglicht eine eindeutigere Unterscheidung von normalen und ACTH-unterdrückten Werten.[2]

ACTH ist ein Sekretionsprodukt der corticotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens.[3] Es wird als Teil des großen, aus 265 Aminosäuren bestehenden Vorläufermoleküls POMC (Proopiomelanocortin) synthesisiert.[5] ACTH ist ein Hormon aus 39 Aminosäuren mit der folgenden Struktur:

NH_2-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe-OH.

Die Sequenz 1-13 entspricht dem alpha-Melanozyten-stimulierenden Hormon. Die Sequenz 1-26 gilt als aktiver Molekülteil und wird für die biologische Aktivität benötigt.[4]

Das ACTH-Molekül ist ein basisches Protein und reagiert labil auf die Aktion von proteolytischen Enzymen. Es verstärkt die Synthese und Freisetzung aller adrenalen Corticosteroide aus der Nebennierenrinde, einschließlich Cortisol, Aldosteron und der adrenalen Androgene. Zu den wichtigsten Faktoren, die eine ACTH-Freisetzung bewirken, gehören CRH (Corticotropin-releasing-Hormon), die Konzentration von freiem Cortisol im Plasma, Stress und der Schlaf-Wach-Rhythmus. Die ACTH-Konzentration wird durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus und das Zentralnervensystem gesteuert. Die ACTH-Konzentration steigt bei einer Abnahme des Cortisol-Spiegels im Plasma an. Wenn der Cortisol-Spiegel steigt, wird die ACTH-Freisetzung auf der Ebene der Hypophyse gehemmt.[3]

ACTH wird von der Hypophyse pulsierend ausgeschüttet, die Ausschüttung folgt jedoch einem bestimmten Tagesrhythmus. Der ACTH-Spiegel ist bei normalen Individuen in den frühen Morgenstunden (6-8 Uhr) in der Regel am höchsten und gegen Ende des Tages am niedrigsten. Aus diesem Grunde erfolgt die Blutabnahme zur ACTH-Bestimmung morgens. Der normale Tagesrhythmus wird durch Erkrankungen wie dem Cushing-Syndrom und dem ektopischen ACTH-Syndrom sowie durch physiologischen Stress wie z. B. Operationen gestört.[6-8]

Die ACTH-Ergebnisse werden in Verbindung mit anderen diagnostischen Tests verwendet, um Patienten mit verschiedenen Nebennierenerkrankungen zu beurteilen. Beim Cushing-Syndrom handelt es sich um eine Stoffwechselstörung, die auf eine erhöhte Cortisol-Produktion durch die Nebenniere zurückzuführen ist. Die Diagnose des Cushing-Syndroms hängt davon ab, wie gut die erhöhte Cortisol-Produktion und die fehlende Dexamethason-Suppression nachgewiesen werden können. Sobald die Diagnose gestellt ist, werden weitere Tests durchgeführt, um die Ursache zu bestimmen.[3,9,10] Dieses Syndrom wird gewöhnlich durch Nebennierenhyperplasie und eine hypophysäre ACTH-Überproduktion verursacht. Die Cortisol-Überproduktion ist entweder auf eine Hypersekretion von hypophysärem ACTH oder eine ektope Produktion von ACTH durch nicht endokrine Tumoren zurückzuführen.

Der Begriff “Morbus Cushing” definiert traditionell eine Person mit einem ACTH-produzierenden Hypophysentumor; einige Ärzte verwenden diesen Begriff jedoch, um jegliche Personen mit Hypersekretion von hypophysärem ACTH zu beschreiben - unabhängig davon, ob ein Tumor vorliegt oder nicht.

Wenn das Cushing-Syndrom durch eine übermäßige Ausschüttung von hypophysärem ACTH verursacht ist, kann es zu einem Anstieg des ACTH-Spiegels kommen. Der Ort, an dem ACTH in corticotropen Mikroadenomen produziert wird, wurde durch bilaterale Katheterisierung des Sinus petrosus inferior lokalisiert.[11,12]

Ein ektopisches ACTH-Syndrom kann eine weitere Ursache des Cushing-Syndroms sein. Bei diesen Patienten produzieren nicht endokrine maligne Tumoren hohe Konzentrationen von ACTH und POMC, was zu einer sehr hohen Cortisol-Produktion führt, bei der es zu keiner Rückkopplungshemmung kommt.[13,14]

Wenn das Cushing-Syndrom auf eine primäre Anomalie der Nebennieren, wie z. B. einen Nebennierentumor, zurückzuführen ist, arbeitet die Nebenniere unabhängig vom ACTH, und die hypophysäre Sekretion wird unterdrückt. Diese Patienten weisen sehr niedrige oder nicht nachweisbare ACTH-Konzentrationen auf und zeigen keine Reaktion bei Dexamethason-Suppression oder Metyrapon-Stimulationstests.[3]

Nebenniereninsuffizienz ist eine Erkrankung, die zu einer inadäquaten Cortisol-Produktion führt. Sie kann auf eine primäre Unfähigkeit der Nebenniere, ausreichende Mengen Cortisol zu produzieren, oder auf eine sekundäre Störung aufgrund einer ungenügenden ACTH-Produktion zurückzuführen sein. Die basale ACTH-Konzentration von Patienten mit primärer Nebennierenrindeninsuffizienz (Morbus Addison) ist deutlich erhöht. Auf verabreichtes endogenes ACTH sprechen die Nebennieren bei diesen Patienten nicht an. Eine sekundäre Nebenniereninsuffizienz wird durch einen hypophysären ACTH-Mangel verursacht. Die Differenzierung zwischen primärer und sekundärer Nebenniereninsuffizienz kann mit Hilfe des ACTH-Spiegels im Plasma erfolgen, da die ACTH-Werte bei der primären Nebenniereninsuffizienz erhöht sind und bei der sekundären Nebenniereninsuffizienz niedriger sind oder ganz fehlen.[3]

Das Nelson-Syndrom ist durch die Entwicklung großer Hypophysentumoren bei Patienten nach beidseitiger Adrenalektomie wegen des Cushing-Syndroms gekennzeichnet. Die ACTH-Werte werden bei diesen Patienten in der Regel kontrolliert, um den klinischen Verlauf der Erkrankung und das Ansprechen auf entsprechende Therapien zu überwachen.[15,16]

3. TESTPRINZIP

Der DiaSorin ACTH IRMA ist ein hoch spezifischer und sensitiver immuno-radiometrischer Assay zur Messung von humanem ACTH 1-39. Dazu werden zwei ACTH-Antikörper verwendet, die für verschiedene Regionen des ACTH-Moleküls spezifisch sind. Der in diesem System eingesetzte iodierte Tracer enthält einen gereinigten polyklonalen ACTH 26-39-spezifischen Ziegenantikörper und einen mit Iod-125 markierten monoklonalen ACTH 1-17-spezifischen Antikörper. Wenn die Proben mit dem Tracer und den mit einem Maus-anti-Ziege-Antikörper beschichteten Polystyrolkügelchen inkubiert werden, binden die ACTH-spezifischen Antikörper an das ACTH der Probe. Nur in der Probe vorliegendes ACTH 1-39 bindet an beide Antikörper und bildet so einen Antikörperkomplex. Die ungebundene Radioaktivität wird durch Waschen entfernt, und die an die Kügelchen gebundene Radioaktivität wird gemessen. Die Konzentration von ACTH in der Probe ist direkt proportional zur gemessenen Radioaktivität. Die Ergebnisse werden durch Vergleich der Impulse pro Minute (I/M) jeder Probe mit dem I/M-Wert für die in diesem Kit enthaltenen ACTH-Kalibratoren berechnet.

4. KITREAGENZIEN

ACTH IRMA Nullkalibrator	1 Fläschchen / 5,0 ml	1 Fläschchen / 5,0 ml
ACTH IRMA Kalibratoren (1-5)	5 Fläschchen / 2,0 ml	5 Fläschchen / 2,0 ml
ACTH IRMA Kügelchen	1 Behälter / 65 Kügelchen	2 Behälter / 65 Kügelchen
ACTH IRMA Tracer	2 Fläschchen / 2 ml	4 Fläschchen / 2 ml
ACTH IRMA Waschlösung	1 Fläschchen / 50 ml	1 Fläschchen / 50 ml
ACTH IRMA Kontrollen (Stufen 1-3)	3 Fläschchen / 2,0 ml	3 Fläschchen / 2,0 ml
Anzahl der Tests	65	130

LAGERUNG: Der Kit sollte bei 2-8°C aufbewahrt werden. Sofern nicht anders angegeben, nach dem Öffnen alle Reagenzien bei 2-8°C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum lagern. Die Reagenzien dürfen nach dem Verfallsdatum nicht verwendet werden. Das Verfallsdatum des Kits ist auf dem äußeren Etikett angebracht und entspricht dem Verfallsdatum des Tracers.

Bei der Rekonstitution den Inhalt der Fläschchen vorsichtig mischen, um Schaumbildung zu vermeiden. Alle rekonstituierten Reagenzien wie weiter unten empfohlen aufbewahren. Reagenzien aus verschiedenen Chargen dürfen nicht vermischt werden.

4.1 ACTH IRMA Kalibratoren (0-5): lyophilisiertes Reagenz
Satz von sechs synthetischen ACTH (1-39)-Kalibratoren in Konzentrationen von 0-1500 pg/ml, in ACTH-freiem Humanplasma mit Stabilisatoren und 0,1 % Natriumazid als Konservierungsmittel. Jeder Charge sind genaue Konzentrationswerte zugeteilt. Die Kalibratoren wurden gegen synthetisches humanes ACTH (1-39) kalibriert. Das HPLC-gereinigte synthetische humane ACTH wurde getestet. Seine Reaktion entsprach der des synthetischen humanen ACTH (1-39) des National Hormone and Pituitary Program (Universität Maryland). Die Kitkalibratoren sind mit Patientenproben austauschbar, wenn sie mit Reagenzien verwendet werden und dieser diagnostische *In-vitro*-Test wie empfohlen durchgeführt wird. Jedes Fläschchen mit 2,0 ml gereinigtem Wasser rekonstituieren. Die Kalibratoren bei Raumtemperatur 25-30 Minuten lang drehen oder 60 Minuten lang stehen lassen und dabei häufig mischen, bis sich der Inhalt vollständig aufgelöst hat. Vor dem Gebrauch gründlich mischen. Die rekonstituierten Kalibratoren wie folgt lagern:
Für einen Zeitraum von bis zu 5 Tagen: Bei 2-8°C lagern.
Für eine längere Lagerung (Verfallsdatum) zwischen dem Gebrauch: Bei -15°C oder darunter lagern.
Die Kalibratoren (einschließlich des Nullkalibrators) können bis zu dreimal eingefroren und aufgetaut werden. Die Kalibratoren können während ihrer Lagerung bei 2-8°C für maximal vier 1-Stunden-Intervalle bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

4.2 ACTH IRMA Kügelchen: gebrauchsfertiges Reagenz
Die Polystyrolkügelchen sind mit einem polyklonalen Maus-anti-Ziege-Antikörper beschichtet.

4.3 ^{125}I ACTH IRMA Tracer: gebrauchsfertiges Reagenz
Jedes Fläschchen enthält 2 ml polyklonales Ziege-anti-ACTH und ^{125}I-markiertes monoklonales Maus-anti-ACTH, verdünnt in gepuffertem Serum mit rotem Farbstoff und 0,1 % Natriumazid.

4.4 ACTH IRMA Waschlösungskonzentrat: Flüssigkeitslösung
Enthält ein konzentriertes, gepuffertes Tensid. Zur Zubereitung der Arbeitswaschlösung den gesamten Fläschcheninhalt mit 500 ml destilliertem oder entionisiertem Wasser verdünnen.

4.5 ACTH IRMA Kontrolle, Level 1-3: lyophilisiertes Reagenz

Humanplasma wird mit der entsprechenden Menge an synthetischem humanem ACTH versetzt. Es werden 0,1 % Natriumazid und andere Stabilisatoren zugefügt. Jedes Fläschchen mit 2,0 ml gereinigtem Wasser rekonstituieren. Die Kontrollen bei Raumtemperatur 25-30 Minuten lang drehen oder 60 Minuten lang stehen lassen und dabei häufig mischen, bis sich der Inhalt vollständig aufgelöst hat. Vor dem Gebrauch gründlich mischen. Jede Kontrolle als unbekannte Probe behandeln. Die Werte für die einzelnen Chargen sind auf den Kontrollfläschchen aufgedruckt. Die rekonstituierten Kontrollen wie folgt lagern:

Für einen Zeitraum von bis zu 5 Tagen: Bei 2-8°C lagern.

Für eine längere Lagerung (Verfallsdatum) zwischen dem Gebrauch: Bei -15°C oder darunter lagern.

Die Kontrollen können bis zu dreimal eingefroren und aufgetaut werden. Die Kontrollen können während ihrer Lagerung bei 2-8°C für maximal vier 1-Stunden-Intervalle bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

5. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

NUR ZUR *IN-VITRO*-DIAGNOSTIK

Nicht für internen oder externen Gebrauch bei Menschen oder Tieren.

REAGENZIEN MIT MATERIAL HUMANEN URSPRUNGS

Dieses Produkt ist als potenzieller Infektionserreger zu behandeln.

Alle in der Herstellung dieses Produktes verwendeten Serum- bzw. Plasmaspendeeinheiten wurden nach einer FDA-genehmigten Methode getestet und für nicht reaktiv auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg), Hepatitis-C-Antikörper (HCV) und Antikörper für HIV-1/2 befunden. Obwohl diese Methode äußerst genau ist, bietet sie keine Gewähr dafür, dass alle infizierten Einheiten identifiziert werden können. Dieses Produkt kann auch Material humanen Ursprungs enthalten, für welches es noch kein genehmigtes Testverfahren gibt. Da keine der zur Zeit bekannten Testmethoden absolute Gewähr für die Abwesenheit des Hepatits-B-Virus (HBV), Hepatitis-C-Virus (HCV), des Retrovirus (HIV) oder anderer Infektionserreger bieten kann, sind alle Produkte mit Komponenten humanen Ursprungs unter Einhaltung guter Laborpraktiken und entsprechender Vorsichtsmaßnahmen laut Empfehlungen des Leitfadens der Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health (amerikanische Krankheitsforschungszentren/Staatliche Gesundheitsinstitute): “Biosafety in Micro-biological and Biomedical Laboratories” (Biosicherheit in mikrobiologischen und biomedizinischen Laboren), 4. Auflage, Mai 1999, oder aktuelle Auflage, als potenzielle infektiöse Substanzen zu behandeln.

REAGENZIEN MIT NATRIUMAZID

VORSICHT: Diese Packung enthält Reagenzien mit Natriumazid, das gegebenenfalls mit Blei- oder Kupferleitungen reagieren und höchst explosive Metallazide bilden kann. Zur Entsorgung mit reichlichst Wasser nachspülen, um Azidaufbau zu vermeiden. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt “Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts” (Dekontaminierung von Abflüssen in Laborspülbecken zur Entsorgung von Azidsalzen) des Handbuches "Safety Management" (Sicherheitsmaßnahmen), Nr. CDC-22, herausgegeben von Centers for Disease Control and Prevention (US-Krankheitsforschungszentren), Atlanta, Bundesstaat Georgia, 1976.

Europäische Gemeinschaften: Gefahrenbezeichnungen für gefährliche Stoffe (Richtlinie 1999/45/EG)

R 20/21/22 - Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.

R 32 - Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.

S28 - Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen.

REAGENZIEN MIT IOD-125

Dieser Kit enthält radioaktives Material mit maximal 7,2 µCi (266 kBq) Iod-125. Bei der Lagerung, Handhabung und Entsorgung dieses Materials sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen und gute Laborpraktiken einzuhalten. Für Ärzte oder Einrichtungen, die im Rahmen einer Generallizenz Radioisotope erhalten: Entgegennahme, Erwerb, Besitz und Verwendung dieses radioaktiven Materials sind nur Ärzten, veterinärmedizinisch tätigen Tierärzten, klinischen Laboren oder Krankenhäusern und nur für klinische *In-vitro*-Tests oder In-vitro-Labortests gestattet, bei denen kein interner oder externer Kontakt des Materials oder seiner Strahlung mit Menschen oder Tieren stattfindet. Entgegennahme, Erwerb, Besitz, Verwendung und Weitergabe des Materials unterliegen den Vorschriften und der Generallizenz der US Nuclear Regulatory Commission (US-amerikanische Strahlenschutzbehörde) bzw. des Staates, mit dem diese Behörde ein Abkommen zur Ausübung ihrer Überwachungsfunktion abgeschlossen hat.

1. Die Lagerung des radioaktiven Materials ist auf einen speziell dafür bestimmten Bereich zu beschränken.
2. Der Zugang zu radioaktivem Material ist nur befugten Personen zu gestatten.
3. Radioaktives Material nicht mit dem Mund pipettieren.
4. Im vorgesehenen radioaktiven Arbeitsbereich nicht essen oder trinken.
5. Verschüttetes Material aufwischen und Bereich anschließend mit alkalischem Reinigungsmittel oder radiologischer Dekontaminationslösung waschen. Alle benutzten Glasbehälter vor dem Waschen mit anderen Laborbehältern aus Glas gründlichst mit Wasser spülen.

Für Ärzte oder Einrichtungen, die im Rahmen einer Sondergenehmigung Radioisotope erhalten:

Entgegennahme, Gebrauch, Weitergabe und Entsorgung radioaktiven Materials unterliegen den Vorschriften und Bedingungen der jeweiligen Sondergenehmigung.

WARNHINWEIS: Dieses Produkt enthält eine Chemikalie, die nach Angaben des US-Bundesstaates Kalifornien krebserregend ist.

ACHTUNG: Die auf der Packungsbeilage angegebene Radioaktivität kann von der auf dem Etikett des Kartons und des Tracer-Fläschchens angegebenen etwas abweichen. Sowohl das Etikett des Kartons als auch das Etikett des Tracer-Fläschchens geben den tatsächlichen Wert der Radioaktivität am Kalibrationsdatum an, während die Packungsbeilage die theoretische Radioaktivität darstellt.

6. ANZEICHEN FÜR MÖGLICHEN VERFALL DER KITREAGENZIEN

6.1 Eine Verschiebung der Steigung oder Position der Eichkurve im Vergleich zu den normalen Ergebnissen.

6.2 Eine Abnahme der maximalen Bindung.

6.3 Eine hohe nichtspezifische Bindung.

6.4 Geringe Duplikatwerte.

7. PROBENGEWINNUNG UND VORBEREITUNG VON PLASMA

Für die Untersuchung des Probenmaterials (im Duplikat) des ACTH IRMA werden vierhundert Mikroliter EDTA-Plasma benötigt. Heparinisierte Proben sollten im ACTH IRMA nicht verwendet werden. Es sollten keine ikterischen, hämolysierten oder lipämischen Proben verwendet werden.

Blut sollte unter aseptischen Bedingungen durch Venenpunktion in ein 5- oder 10-ml-EDTA-Vacutainer-Röhrchen abgenommen werden. Die Probe durch vorsichtiges Umdrehen mischen und sofort auf zerkleinertes Eis stellen. Die Probe innerhalb von 30 Minuten nach der Gewinnung zentrifugieren. Ungefährt 15 Minuten lang mit 1500 x g* zentrifugieren. Plasma sofort mit einer Kunststoffpipette aus den Zellen entfernen und in ein Polypropylen-/Polystyrol-Röhrchen geben. Plasmaproben vor der Untersuchung bei 2-8°C lagern, wenn der Assay innerhalb von 4 Stunden durchgeführt werden kann.

Wenn die Proben nicht innerhalb von 4 Stunden untersucht werden können, müssen die Proben bei -20°C gelagert werden. Die Proben können bis zu 4 Stunden bei 2-8°C oder bis zu 6 Monate bei –20°C aufbewahrt werden.

HINWEIS: DiaSorin-Studien an frisch gewonnenen Proben zeigten, dass die ACTH-Konzentration nach einmaligem Einfrieren und Auftauen um durchschnittlich 20-35 % abnimmt. Nach dreimaligem aufeinander folgendem Einfrieren und Auftauen wurden minimale Veränderungen beobachtet.

Es wurde eine Studie (n = 50) mit silikonisierten im Vergleich zu nicht silikonisierten Röhrchen durchgeführt. Das geometrische Mittel für die silikonisierten Röhrchen betrug 28,8 pg/ml (2SD-Bereich 13,9-59,7). Das geometrische Mittel für die nicht silikonisierten Röhrchen betrug 26,7 pg/ml (2SD-Bereich 12,4-57,5).

8. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND MATERIALIEN

8.1 Einweg-Röhrchen aus Polypropylen oder Polystyrol, 12 x 75 mm
Borosilikatglasröhrchen dürfen nicht verwendet werden.

8.2 Röhrchenständer

8.3 Gammazähler zur Messung von Iod-125

8.4 Vibrationsmischer (Vortex)

8.5 Pipettiergeräte:

- **a.** Mikropipettierer zur Abgabe von 50 µl und 200 µl
- **b.** Multipipetten mit Einstellungen zur Abgabe von 50 µl, 200 µl und 1 ml
- **c.** Messpipetten zur Rekonstitution von Kontrollen und Kalibratoren; 2,0 ml und 5,0 ml

8.6 500-ml-Messzylinder

8.7 Parafilm oder gleichwertige Abdeckung für Teströhrchen

8.8 Teflonüberzogene Pinzette oder anderes Instrument zur Abgabe der Kügelchen

8.9 Aspirationsgerät

8.10 Gereinigtes Wasser zur Rekonstitution der Komponenten

9. TESTVERFAHREN

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden.

9.1 Rekonstitution von ACTH IRMA Kalibratoren / Kontrollen

- **a.** Lyophilisierte ACTH IRMA Kalibratoren und Kontrollen aus dem Kühlschrank nehmen.
- **b.** Mit einer Messpipette 2,0 ml gereinigtes Wasser zu den ACTH IRMA Kalibratoren und Kontrollen geben. In gleicher Weise 5,0 ml entionisiertes oder destilliertes Wasser zum ACTH Nullkalibrator geben.

* g = (1118×10^{-8}) (Radius in cm) $(\text{U/min})^2$

c. Mit den Fingern vorsichtig auf die Flaschen klopfen, um das lyophilisierte Pellet zu entfernen, und dann vorsichtig mischen.

d. Die Kalibratoren und Kontrollen bei Raumtemperatur 25-30 Minuten lang drehen oder 60 Minuten lang stehen lassen und dabei häufig mischen, bis sich der Inhalt vollständig aufgelöst hat. Vor dem Gebrauch gründlich mischen.

e. Die Rekonstitution ist abgeschlossen, wenn die gesamte Lösung homogen aussieht.

9.2 Vorbereitung der ACTH IRMA Waschlösung

Das ACTH IRMA Arbeitswaschlösungskonzentrat wird im Verhältnis 1:10 in gereinigtem Wasser zu einer Arbeitslösung verdünnt.

a. Die 50-ml-Flasche mit dem Konzentrat in einen 500-ml-Messzylinder geben.

b. Nach der Zugabe den Inhalt der Flasche mit gereinigtem Wasser spülen und das Spülwasser des Konzentrats in den 500-ml-Messzylinder geben.

a. Gereinigtes Wasser weiter zugeben, bis das Volumen im 500-ml-Messzylinder 500 ml beträgt. Den Inhalt umrühren, damit sich jegliches ausgefälltes Material vollständig auflöst und gleichmäßig vermischt. Dieses Material als ACTH IRMA Arbeitswaschlösung beschriften.

9.3 Richtig beschriftete 12 x 17 mm Polypropylen-/Polystyrol-Röhrchen in doppelter Ausführung vorbereiten.

Reagenzien den Röhrchen wie folgt zugeben:

a. Nullkalibrator
200 µl Nullkalibrator
50 µl ^{125}I ACTH IRMA Tracer (rot)

b. Kalibratoren (1-5)
200 µl Kalibrator
50 µl ^{125}I ACTH IRMA Tracer (rot)

c. Kontrollen und unbekannte Proben
200 µl Probe
50 µl ^{125}I ACTH IRMA Tracer (rot)

9.4 Den Ständer mit allen Röhrchen dreimal jeweils 1-2 Sekunden lang auf dem Vortex mischen. Dabei muss eine Schaumbildung vermieden werden.

9.5 Mit der teflonüberzogenen Pinzette oder einem anderen geeigneten Instrument zur Abgabe von Kügelchen in jedes Röhrchen ein ACTH IRMA Kügelchen geben (nicht mit den Fingern!).

9.6 Röhrchen mit Parafilm oder gleichwertigem Material abdecken.

Röhrchen bei 18-25°C 20 (±2) Stunden inkubieren. Am Anfang und am Ende des Assays die Temperatur notieren.

Nach der 20-stündigen Inkubation (±2 Stunden) werden die Röhrchen wie folgt gewaschen:

a. Die Reagenzmischung in einen geeigneten Behälter für radioaktiven Abfall aspirieren.

b. Jedes Röhrchen mit der ACTH IRMA Arbeitswaschlösung waschen.

Kügelchen waschen. Dazu 1 ml Waschlösung mit so viel Kraft in jedes Röhrchen einfüllen, dass das Kügelchen vom Boden des Teströhrchens hochgehoben wird. Nach jedem Waschschritt aspirieren. Das Waschverfahren zweimal für insgesamt drei Waschgänge wiederholen.

* g = (1118×10^{-8}) (Radius in cm) $(U/min)^2$

9.7 Die in jedem Röhrchen vorhandene Radioaktivität mit dem Gammamesser messen. Die Röhrchen sollten mindestens 1 Minute lang gemessen werden (siehe Abschnitt "Grenzen des Verfahrens").

10. ANMERKUNGEN ZUM VERFAHREN

10.1 Bei der Zugabe der Kügelchen in die Teströhrchen den Röhrchenständer etwas neigen und die Kügelchen in die Röhrchen hineinrollen lassen. Dadurch wird übermäßiges Verspritzen der Testlösung vermieden. Kügelchen nicht mit den Fingern berühren.

10.2 Den125I ACTH IRMA Tracer in das untere Drittel des Teströhrchens pipettieren.

10.3 Wenn die Werte einer Probe größer sind als die größten Kalibratorwerte, ist die Probe entsprechend mit Nullkalibrator zu verdünnen und neu zu testen.

10.4 Alle Patientenproben MÜSSEN bis zur Untersuchung auf Eis aufbewahrt werden.

10.5 Die Kügelchen müssen gründlich gewaschen werden, damit optimale Leistungsmerkmale erzielt werden.

10.6 In Assays mit bis zu 130 Röhrchen wurde kein Assay-Drift beobachtet.

10.7 Für eine komplette Laborkontrolle des beständigen Verhaltens eines IRMA sind zusätzliche Faktoren zu berücksichtigen. DiaSorin empfiehlt, die folgenden Parameter zu überprüfen, um sicherzustellen, dass die Leistung des Kits konstant ist.

a. Maximale Bindung
I/M (Impulse pro Minute) des “5”-Kalibrator-Röhrchens

b. Nichtspezifische Bindung
I/M des Nullkalibrators

11. QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor muss in jedem Assay mindestens eine hohe und eine niedrige Kontrolle einsetzen, um die Leistung des Kits zu überwachen. Es können handelsübliche Kontrollen oder die drei Referenzkontrollen verwendet werden, die im Kit enthalten sind. Die Kitkontrollen enthalten ACTH in für normale und erhöhte Patientenbereiche typische Konzentrationen. Die Kitkontrollen sind mit dem DiaSorin ACTH IRMA Kit getestet worden. Die von DiaSorin bestimmten Bereiche sind auf den Kontrollfläschchen aufgedruckt. Die Kontrollen sollten als unbekannte Proben behandelt und doppelt untersucht werden. Um die Leistung der Kontrollen zu überwachen, sollten vom Labor Qualitätskontrolltabellen geführt werden. Die Kontrollergebnisse sollten mit Hilfe von statistischen Methoden, mit denen Trends richtig ausgewertet werden können, analysiert werden. Jedes Labor sollte mit Hilfe von statistischen Methoden, mit denen sowohl systematische als auch zufällige Fehler erkannt werden können, für jede Kontrollkonzentration akzeptable Leistungsgrenzen festlegen. Die Kontrollergebnisse müssen den Akzeptabilitätskriterien des Labors entsprechen, bevor die Testergebnisse des Patienten mitgeteilt werden können.[17-19]

12. ERGEBNISBERECHNUNG

Zur Bestimmung der Konzentration von ACTH in unbekannten Proben und Kontrollproben wird eine Eichkurve mit den auf dem Fläschchenetikett angegebenen Kalibratorkonzentrationen erstellt. Die Werte für unbekannte Proben werden wie folgt ermittelt:

12.1 Den durchschnittlichen I/M-Wert für jede Kalibrator-, Kontroll- und unbekannte Probe errechnen.

12.2 Auf log-linearem Millimeterpapier den I/M-Wert jeder Kalibratorstufe auf der Ordinate (y-Achse) gegen die Kalibratorkonzentration auf der Abszisse (x-Achse) auftragen.

HINWEIS: Für die Datenanalyse können auch automatische Datenreduktionsprogramme verwendet werden. DiaSorin verwendet Multi-Calc (Pharmacia) mit einem log-I/M Smooth-SPLINE-Anpassungsprogramm. Andere Datenreduktionsmethoden müssen validiert werden, bevor sie regelmäßig eingesetzt werden.

12.3 Die Konzentrationen von ACTH in den Proben aus der Auftragung interpolieren.

12.4 Wenn die Werte einer unbekannten Probe größer sind als die größten Kalibratorwerte, ist die unbekannte Probe mit Nullkalibrator zu verdünnen und neu zu testen.

12.5 Wenn eine unbekannte Probe verdünnt wurde, muss der Wert mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor korrigiert werden.

12.6 Werte, die kleiner als Kalibrator 1, aber größer als 1,5 pg/ml (Sensitivität des Assays) sind, können mit folgender Gleichung geschätzt werden:

$$\text{Werte der unbek. Probe} \quad \frac{\text{I/M-Wert (unbek. Probe)}}{\text{I/M-Wert (Kal. 1)}} \quad \text{x Wert von Kal. 1}$$

12.7 Der Nachweisbereich des Assays liegt zwischen der Konzentration des höchsten Kalibrators und der Assay-Sensitivität.

Musterdaten

TABELLE I und Abbildung 1 zeigen typische Musterdaten und eine Eichkurve für den ACTH IRMA; diese Angaben dienen nur als Beispiel und sind nicht für die Berechnung von Werten zu verwenden. Diese Daten wurden mit einem frischen Tracer erzielt.

Datenreduktion

Das Qualitätskontrolllabor von DiaSorin verwendet eine geglättete Spline-Kurvenanpassung.

TABELLE I
DiaSorin ACTH IRMA Musterdaten

Röhrchen	Doppelte I/M	Durchschn. I/M	Konz. (pg/ml)
Nullkalibrator	563	577	
	591		
Kalibratoren (pg/ml)			
1 (9,9)	1.562	1.627	
	1,692		
2 (23,3)	3.348	3.367	
	3,385		
3 (96,1)	11.573	11.519	
	11,464		
4 (328)	35.676	35.551	
	35,426		
5 (1330)	104.713	102.148	
	99,583		
Unbekannte Proben			
1	3.999	4.132	30
	4,264		
2	13.668	12.831	109
	11,993		
3	41.418	41.488	387
	41,557		

ACTH IRMA MUSTEREICHKURVE

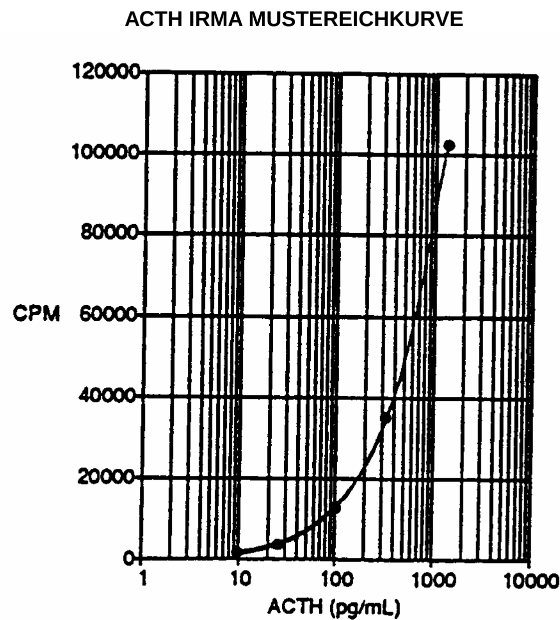


ABBILDUNG 1

13. GRENZEN DES VERFAHRENS

13.1 Die Zählzeiten sollten ausreichend lang sein, um statistische Fehler zu reduzieren (2.000 Zählungen ergeben z. B. 5 % Fehler; 10.000 Zählungen ergeben 1 % Fehler).

13.3 Alle ACTH-Ergebnisse müssen im Zusammenhang mit dem klinischen Gesamtbild und anderen unterstützenden diagnostischen Tests interpretiert werden.

14. ERWARTETE WERTE

DiaSorin Inc. empfiehlt, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzbereich (Normalbereich) festlegt.

Normalbereich

Jedem Labor wird die Ermittlung eines eigenen Normalbereichs empfohlen. DiaSorin ermittelte einen Normalbereich aus 100 eingefrorenen EDTA-Plasmaproben von scheinbar gesunden Freiwilligen (50 weiblich, 50 männlich). Die Proben wurden zwischen 7 und 10 Uhr morgens von nüchternen Spendern in nicht silikonisierten Röhrchen entnommen. Berechnungen ergaben ein geometrisches Mittel von 18,5 pg/ml, mit einem 2SD-Bereich von 6,0-56,7 pg/ml.

15. TESTCHARAKTERISTIKA

15.1 Präzision

Die Intra-Assay- und die Inter-Assay-Variation wurden mit Hilfe des NCCLS-Dokuments EP5-T2 bestimmt. Jedes der drei Zentren untersuchte vier Kontrollen in zwei Testansätzen an zwölf Arbeitstagen.

Intra-Assay-Präzision (Werte in pg/m)

Probennummer	Mittelwert	SD	% VK
1	32,7	1,37	4,20
2	58,0	2,05	3,53
3	194	4,90	2,53
4	773	41,97	5,43

Inter-Assay-Präzision (Werte in pg/ml)
Es wurden die Daten von drei Zentren zusammengefasst.

Probennummer	Mittelwert	SD	% VK
1	32,7	1,88	5,8
2	62,0	6,15	9,9
3	194	9,04	4,7
4	817	87,6	10,7

Die Präzision am unteren Ende des Messbereichs wurde von DiaSorin wie folgt weiter bestimmt:

Inter-Assay-Präzision (Werte in pg/ml)
Jede Probe wurde in 10 getrennten Assays untersucht.

Probennummer	Mittelwert	SD	% VK	n
1	8,65	0,496	5,74	10
2	10,67	0,527	4,94	10
3	257,0	8,126	3,16	10

Intra-Assay-Präzision (Werte in pg/ml)
Jede Probe wurde in einem einzigen Assay in je 10 Replikaten untersucht.

Probennummer	Mittelwert	SD	% VK	n
1	8,6	0,411	4,78	10
2	10,39	0,437	4,21	10
3	260,7	9,22	3,54	10

15.2 Richtigkeit: Die Richtigkeit des Assays wurde mit Hilfe des Linearitäts- und Wiederfindungstests überprüft.

Linearität

Zwei mit EDTA versetzte Proben und ein mit EDTA versetzter Pool wurden mit Nullkalibrator verdünnt. Die Ergebnisse sind unten zusammengefasst (Werte in pg/ml).

Proben-nummer	Verdünnung	Gemessen	Berichtigt nach Verdünnung
1	Unverdünnt	>E Kal.	
	1:2	755	1510
	1:4	,40	1360
	1:8	158	1264
	1:16	84	1344
	1:32	41	1312
	1:67	21	1344
	1:128	11	1408
2	Unverdünnt	1239	
	1:2	644	1287
	1:4	336	1344
	1:8	158	1264
	1:16	80	1280
	1:32	37	1184
	1:67	20	1280
	1:128	9	1152
Pool	Unverdünnt	>E Kal.	
	1:2	713	1426
	1:4	342	1368
	1:8	155	1240
	1:16	78	1248
	1:32	39	1248
	1:67	20	1280
	1:128	10	1380

GENAUIGKEIT

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden repräsentative Daten von drei Probenpools mit ACTH 1-39 versetzt (Werte in pg/ml).

Hintergrund-wert	Zugegeb. ACTH	Erwarteter Wert	Gemessener Wert	Wiederfin-dungsrate
Pool 1	5	22,4	20,4	91,1
17,4	25	42,4	37,6	88,7
	50	67,4	59,8	88,7
	75	92,4	81,1	87,8
	125	142,4	118,5	83,2
	500	517,4	571,7	110,5
			Durchschn. Wiederfindung	91,7
Pool 2	5	37,1	36,2	97,6
32,1	25	57,1	52,3	91,6
	50	82,1	71,1	86,6
	75	107,1	92,8	86,6
	125	157,1	128,3	81,7
	500	532,1	583,0	109,6
			Durchschn. Wiederfindung	92,3
Pool 3	5	36,2	35,5	98,1
31,2	25	56,2	48,9	87,0
	50	81,2	69,0	85,0
	75	106,2	89,6	84,4
	125	156,2	129,7	83,0
	500	531,2	520,6	98,0
			Durchschn. Wiederfindung	87,5

15.3 Analytische Sensitivität

Die Sensitivität, definiert als die zwei Standardabweichungen über den Nullkalibrator-Zählungen gemessene ACTH-Konzentration, beträgt bei minimaler Bindung 1,5 pg/ml oder weniger mit frischem Tracer.

15.4 Spezifität und Kreuzreaktivität

Die Kreuzreaktivität des ACTH IRMA wurde mit folgenden Peptidkonzentrationen ermittelt, die sowohl zu einem niedrigen als auch zu einem mittleren Kalibrator gegeben wurden.

Peptid	Dosis (pg/ml)	Änderung des mittleren Kalibrators (pg/ml)	% Änderung	Änderung des niedrigen Kalibrators (pg/ml)	% Änderung
ACTH 1 - 26	100.000	-304,3	-82,9%	-35,3	-83,0%
	1.000	0,0	0,0%	0,0	0,0%
	500	0,0	0,0%	0,0	0,0%
	200	0,0	0,0%	0,0	0,0%
ACTH 18 - 24	100.000	0,0	0,0%	0,0	0,0%
	50.000	0,0	0,0%	0,0	0,0%
ACTH 26 - 39	100.000	-358,4	-97,7%	-37,1	-87,3%
	5.000	-261,5	-71,3%	-35,0	-82,2%
	2.000	-169,4	-46,2%	-30,5	-71,6%
	1.000	-97,0	-26,4%	-21,5	-50,6%
	500	-45,0	-12,3%	-14,0	-33,0%
ACTH 1 - 10	100.000	0,0	0,0%	0,0	0,0%
	50.000	0,0	0,0%	0,0	0,0%
	1.000	0,0	0,0%	0,0	0,0%
	500	0,0	0,0%	0,0	0,0%
	200	0,0	0,0%	0,0	0,0%
α-MSH	100.000	0,0	0,0%	0,0	0,0%
	1.000	0,0	0,0%	0,0	0,0%
	500	0,0	0,0%	0,0	0,0%
β-MSH	100.000	0,0	0,0%	0,0	0,0%
	50.000	0,0	0,0%	0,0	0,0%
β-Endorphin	100.000	0,0	0,0%	0,0	0,0%
	50.000	0,0	0,0%	0,0	0,0%

LITERATURANGABEN FINDEN SIE AUF DER LETZTEN SEITE

ENSAYO INMUNORADIOMÉTRICO ADRENOCORTICOTRÓPICO

1. INDICACIONES

SÓLO PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS *IN VITRO*.

Este equipo tiene como finalidad la determinación cuantitativa de la hormona adrenocorticotrópica humana (ACTH) en plasma con EDTA. La medición de ACTH en plasma se utiliza para diagnosticar disfunciones adrenales.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La medición de ACTH en plasma humano ha sido de gran interés clínico durante muchos años. En 1948 Sayers et. al. describieron un método para determinar la ACTH en función de su bioactividad.[1] Desde entonces se desarrollaron radioinmunoensayos (RIA) para medir la ACTH, pero estaban basados en un anticuerpo primario que no medía la actividad biológica. El IRMA ACTH de DiaSorin esta diseñado para detectar la molécula completa de ACTH (1-39). El IRMA ACTH es un método más sensible que el RIA para detectar ACTH en plasma y permite una diferenciación más clara de los niveles normales y la inhibición de ACTH.[2]

La hormona ACTH es secretada por las células adrenocorticotrópicas de la glándula pituitaria anterior.[3] Se sintetiza como parte de una molécula más grande de POMC (proopiomelanocortina), precursor de 265 aminoácidos.[5] La ACTH es una hormona de 39 aminoácidos con la siguiente estructura:

NH_2-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe-OH

La secuencia 1-13 es la misma que en la hormona estimulante de melanocitos alfa. La secuencia 1-26 se considera la parte activa de la molécula y es necesaria para una actividad biológica completa.[4]

La molécula de ACTH es una proteína básica inestable ante la acción de las enzimas proteolíticas. Funciona aumentando la síntesis y liberación de todos los corticosteroides adrenales de la corteza adrenal, incluidos el cortisol, la aldosterona y los andrógenos adrenales. Entre los principales factores que influyen en la liberación de ACTH se encuentran la CRH (hormona liberadora de corticotropina), la concentración de cortisol libre en plasma, el estrés y el ciclo circadiano. En el control de la concentración de ACTH intervienen un mecanismo de retroalimentación negativa y el sistema nervioso central. La ACTH aumenta en respuesta a la disminución de los niveles de cortisol plasmático. Por el contrario, cuando el cortisol aumenta, la liberación de ACTH se inhibe en el nivel de la pituitaria.[3]

La ACTH es secretada por la glándula pituitaria de forma pulsátil, pero sigue un ritmo diurno dominante. En general, los niveles de ACTH en un individuo normal son más altos de madrugada (6-8:00 a.m.) y más bajos al final del día, razón por la cual la extracción de sangre para determinar la ACTH suele realizarse a primera hora de la mañana. Se ha demostrado que, entre las enfermedades que alteran el ritmo diurno normal, se encuentran el síndrome de Cushing, el síndrome de ACTH ectópica y el estrés fisiológico que provoca, por ejemplo, una intervención quirúrgica.[6-8]

Los resultados de ACTH se utilizan en combinación con otras pruebas de diagnóstico para evaluar a pacientes con enfermedades asociadas a la corteza adrenal. El síndrome de Cushing es un trastorno metabólico provocado por un aumento de la producción de cortisol en la glándula adrenal. El diagnóstico del síndrome de Cushing se basa en la demostración del aumento de producción de cortisol y la ausencia de inhibición con dexametasona. Una vez dictaminado el diagnóstico se realizan pruebas para determinar su causa.[3,9,10] Este síndrome suele deberse a una hiperplasia adrenal resultante de la superproducción de ACTH hipofisiaria. La superproducción de cortisol se debe a la hipersecreción de ACTH hipofisiaria o a la producción ectópica de ACTH en tumores no endocrinos.

El término «enfermedad de Cushing» se utiliza normalmente para definir a pacientes que tienen un tumor pituitario productor de ACTH; sin embargo, algunos facultativos lo emplean para describir a personas con hipersecreción de ACTH hipofisiaria al margen de la presencia de un tumor.

Cuando el síndrome de Cushing está causado por una secreción excesiva de ACTH hipofisiaria, puede darse una elevación de ACTH. La fuente de producción de ACTH en microadenomas corticotrópicos se ha localizado con una técnica de cateterismo del seno petroso bilateral inferior.[11,12]

El síndrome de ACTH ectópica es otra causa posible del síndrome de Cushing. En estos pacientes, los tumores malignos no endocrinos producen niveles elevados de ACTH y POMC, que a su vez provocan una producción muy alta de cortisol no susceptible de inhibición por retroalimentación en ningún nivel.[13,14]

Cuando el síndrome de Cushing se debe a una anomalía adrenal primaria, como un tumor adrenal, la glándula adrenal actúa independientemente de la ACTH y la secreción pituitaria se inhibe. Estos pacientes tienen una concentración muy baja o no detectable de ACTH y no se advierte ninguna reacción en pruebas de estimulación con metirapona ni inhibición con dexametasona.[3]

La insuficiencia adrenal es una deficiencia que da lugar a la producción inadecuada de cortisol. Puede deberse a una incapacidad primaria de la glándula adrenal para producir suficiente cantidad de cortisol o a un fallo secundario resultante de la producción insuficiente de ACTH. La concentración basal de ACTH en pacientes con insuficiencia adrenocortical (enfermedad de Addison) es notablemente elevada. Cuando se administra ACTH endógena a estos pacientes, las glándulas adrenales no reaccionan. La insuficiencia adrenal secundaria está provocada por la deficiencia de ACTH hipofisiaria. Los niveles de ACTH en plasma pueden ayudar a distinguir entre la insuficiencia adrenal primaria y la secundaria, ya que son elevados en el primer caso y reducidos o nulos en el segundo.[3]

El síndrome de Nelson es un estado producido por el desarrollo de grandes tumores pituitarios en pacientes sometidos a adrenalectomía bilateral por el síndrome de Cushing. Normalmente, en estos pacientes se vigilan los niveles de ACTH para controlar el curso clínico y la respuesta a los regímenes terapéuticos.[15,16]

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El IRMA ACTH de DiaSorin es un ensayo inmunoradiométrico altamente específico y sensible para medir la ACTH 1-39 en seres humanos. Se efectúa con dos anticuerpos de ACTH, cada uno de ellos específico para diferentes regiones de la molécula de ACTH. El trazador yodado utilizado en este sistema contiene un anticuerpo policlonal purificado de cabra específico para ACTH 26-39 y un anticuerpo monocolonal etiquetado con yodo 125 específico para ACTH 1-17. Cuando las muestras se incuban con el trazador y los glóbulos de poliestireno recubiertos de anticuerpos de ratón anticabra, los anticuerpos específicos de ACTH se unen a la ACTH presente en la muestra. Sólo la ACTH 1-39 presente en la muestra se une a ambos anticuerpos para formar un complejo. La radiactividad libre es arrastrada y se mide la radiactividad unida al glóbulo. La concentración de ACTH presente en la muestra es directamente proporcional a la radiactividad medida. Los resultados se calculan comparando las cuentas por minuto (CPM) de cada muestra con las CPM de los calibradores ACTH incluidos en el equipo.

4. REACTIVOS SUMINISTRADOS CON EL EQUIPO

Calibrador 0 IRMA ACTH Calibradores (1-5) IRMA ACTH Glóbulos IRMA ACTH Trazador IRMA ACTH Solución de lavado IRMA ACTH Controles (niveles 1-3) IRMA ACTH	1 vial/5 mL 5 viales/2 mL 1 depósito/65 glóbulos 2 viales/2 mL 1 vial/50 mL 3 viales/2 mL	1 vial/5 mL 5 viales/2 mL 2 depósitos/65 glóbulos 4 viales/2 mL 1 vial/50 mL 3 viales/2 mL
Número de pruebas	65	130

ALMACENAMIENTO: Tras su recepción, el equipo debe almacenarse a 2-8°C. Una vez abiertos, almacene los reactivos a 2-8°C hasta la fecha de caducidad de la etiqueta a menos que se indique lo contrario en este texto. Los reactivos no deben utilizarse una vez caducados. La fecha de caducidad del equipo se indica en la etiqueta externa y se corresponde con la fecha de caducidad del trazador.

Cuando reconstituya el contenido de los viales, mezcle suavemente para evitar la formación de espuma. Almacene todos los reactivos reconstituidos como se recomienda a continuación. No deben mezclarse reactivos de diferentes lotes.

4.1 Calibradores (0-5) IRMA ACTH: reactivo liofilizado
Juego de seis calibradores de ACTH (1-39) sintética con concentraciones que oscilan entre 0-1500 pg/mL, en plasma humano sin ACTH y azida sódica al 0,1% como conservante. Los valores de concentración exactos se asignan con cada lote. Los calibradores se calibran con ACTH (1-39) humana sintética. La ACTH humana sintética purificada por CLAR se ha probado y ha reaccionado de forma equiparable a la ACTH (1-39) humana sintética obtenida en el programa National Hormone and Pituitary Program (Universidad de Maryland). Los calibradores del equipo han demostrado tener conmutabilidad con muestras de pacientes cuando se utilizan con los reactivos y el procedimiento recomendados para esta prueba de diagnóstico *in vitro*. Reconstituya cada vial con 2 mL de agua purificada. A temperatura ambiente, gire los calibradores durante 25-30 minutos o déjelos reposar durante 60 minutos mezclando con frecuencia hasta que el contenido se haya disuelto por completo. Mezcle bien antes de usar. Almacene los calibradores reconstituidos como sigue:
Para periodos de hasta 5 días: Almacene a 2-8°C.
Para almacenamiento prolongado (caducidad del equipo) entre usos: Almacene a -15°C o menos.
Los calibradores (incluido el calibrador 0) pueden congelarse y descongelarse un máximo de tres veces. Los calibradores pueden conservarse a temperatura ambiente un máximo de cuatro intervalos de 1 hora durante su almacenamiento a 2-8°C.

4.2 Glóbulos IRMA ACTH : reactivo listo para su uso
Los glóbulos de poliestireno están revestidos con anticuerpos policlonales de ratón anticabra.

4.3 Trazador IRMA ACTH 125: reactivo listo para su uso
Cada vial contiene 2 mL de anticuerpos policlonales de cabra anti-ACTH y anticuerpos monoclonales de ratón anti-ACTH etiquetados con yodo ^{125}I diluidos en suero tamponado con tintura roja y azida sódica al 0,1%.

4.4 Concentrado de solución de lavado IRMA ACTH: solución líquida
Contiene un surfactante tamponado concentrado. Prepare una solución de lavado activa diluyendo la totalidad del contenido del vial en un volumen total de 500 mL con agua destilada o desionizada.

4.5 Control IRMA ACTH, niveles 1-3: reactivo liofilizado

Se agrega a plasma humano la cantidad adecuada de ACTH humana sintética y después azida sódica al 0,1% y otros estabilizadores. Reconstituya cada vial con 2 mL de agua purificada. A temperatura ambiente, gire los controles durante 25-30 minutos o déjelos reposar durante 60 minutos mezclando con frecuencia hasta que el contenido se haya disuelto por completo. Mezcle bien antes de usar. Trate los controles como muestras desconocidas. Los valores de cada lote están impresos en los viales de control. Almacene los controles reconstituidos como sigue:

Para periodos de hasta 5 días: Almacene a 2-8°C.

Para almacenamiento prolongado (caducidad del equipo) entre usos: Almacene a -15°C o menos.

Los controles pueden congelarse y descongelarse un máximo de tres veces. Los controles pueden conservarse a temperatura ambiente un máximo de cuatro intervalos de 1 hora durante su almacenamiento a 2-8°C.

5. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

SÓLO PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS *IN VITRO.*

No debe destinarse al uso interno o externo en seres humanos ni animales.

REACTIVOS QUE CONTIENEN MATERIAL DE ORIGEN HUMANO

Trátense como potencialmente infecciosos.

Todas las unidades de donantes de suero/plasma para la preparación de este producto se han probado en conformidad con un método aprobado por la FDA estadounidense y han dado resultados negativos para la presencia de AgsHB, anticuerpos de VHC y anticuerpos de VIH 1/2. Aunque estos métodos son altamente precisos, no garantizan la detección de todas las unidades infectadas. Este producto también puede contener otros materiales de origen humano para los cuales no existe prueba homologada. Dado que ningún método de prueba puede garantizar plenamente la ausencia del virus de la hepatitis B (VHB), de la hepatitis C (VHC), el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) u otros agentes infecciosos, todos los productos que contengan material de origen humano se deben manejar de acuerdo con las prácticas de laboratorio correctas utilizando las precauciones adecuadas que se describen en «Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories», 4ª ed., mayo 1999 o actual, para centros de control de enfermedades e institutos nacionales de salud y prevención.

REACTIVOS CON CONTENIDO DE AZIDA SÓDICA

PRECAUCIÓN: Algunos reactivos de este equipo contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre y formar azidas metálicas altamente explosivas. Antes de desechar el reactivo, enjuáguelo con abundante agua para impedir la acumulación de azidas. Para obtener más información, consulte «Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts» en Manual Guide-Safety Management nº CDC-22, publicado por Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 1976.

Advertencias establecidas en la Comunidad Europea sobre el riesgo de sustancias peligrosas (Directiva del Consejo 1999/45/CE)

R 20/21/22 - Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.

R 32 - En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.

S28 - En caso de contacto con la piel, lávese inmediatamente con abundante agua.

REACTIVOS CON CONTENIDO DE YODO 125

Este equipo contiene material radiactivo que no excede de 7,2 µCi (266 kBq) de yodo 125. Para almacenar, manejar y desechar este material, deben adoptarse las precauciones necesarias y prácticas de laboratorio correctas. Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia genérica: Este material radiactivo sólo deben recibirlo, adquirirlo, poseerlo y utilizarlo médicos, veterinarios que practiquen la medicina veterinaria, laboratorios clínicos u hospitales, y sólo para pruebas *in vitro*

clínicas o de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa del material ni su radiación a seres humanos ni animales. Su recepción, adquisición, posesión, uso y transferencia se rigen por la normativa y la licencia genérica de la Comisión Reguladora Nuclear del estado en el que la Comisión haya llegado a un acuerdo para el ejercicio de su autoridad reguladora.

1. El almacenamiento del material radiactivo debe limitarse a un área destinada específicamente a tal efecto.
2. El acceso a materiales radiactivos debe estar limitado únicamente al personal autorizado.
3. No vierta material radiactivo con la pipeta en la boca.
4. No coma ni beba dentro de las áreas destinadas a trabajos radiactivos.
5. Las áreas donde se produzcan derrames deben limpiarse y después lavarse con un detergente alcalino o una solución descontaminante radiológica. Todo recipiente de vidrio utilizado debe enjuagarse completamente con agua antes de lavarse con otros recipientes de laboratorio.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia específica: La recepción, uso, transferencia y eliminación de los materiales radiactivos se rigen por la normativa y las condiciones de la licencia en cuestión.

ADVERTENCIA: Este producto contiene una sustancia química conocida en el estado de California como causante de cáncer.

ATENCIÓN: La radiactividad que indica el prospecto del paquete puede diferir ligeramente de la impresa en la etiqueta de la caja y en la del vial del trazador. La etiqueta de la caja y la del trazador indican la cantidad real de radiactividad en la fecha de la calibración, mientras que el prospecto del paquete indica la radiactividad teórica del equipo.

6. INDICACIONES DE POSIBLE DETERIORO DE LOS REACTIVOS DEL EQUIPO

6.1 Desviación en la pendiente o posición de la curva del calibrador con respecto al resultado habitual

6.2 Disminución de la unión máxima

6.3 Unión cero no específica alta

6.4 Valores duplicados deficientes

7. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA Y PREPARACIÓN DEL PLASMA

Para analizar la muestra por duplicado en el IRMA ACTH hacen falta cuatrocientos microlitros de plasma con EDTA. En el IRMA ACTH no deben emplearse muestras heparinizadas ni tampoco muestras excesivamente ictéricas, hemolizadas o lipémicas.

La sangre debe recolectarse asépticamente por punción venosa en un tubo Vacutainer de 5 ó 10 mL con EDTA. Mezcle la muestra invirtiéndola suavemente y colóquela de inmediato en hielo picado. Centrifugue la muestra en los 30 minutos siguientes a la recolección. El centrifugado debe durar 15 minutos con aproximadamente 1500 x g*. Retire inmediatamente el plasma de las células con una pipeta de plástico y transfiéralo a un tubo de polipropileno/poliestireno. Almacene las muestras de plasma a 2-8°C antes de la prueba siempre que ésta vaya a realizarse en las 4 horas siguientes. Si las muestras no van a analizarse en las 4 horas siguientes, deben almacenarse a -20°C. Las muestras pueden almacenarse a 2-8°C durante un máximo de 4 horas o a -20°C durante un máximo de 6 meses.

NOTA: Los estudios de DiaSorin con muestras recién recolectadas muestran como promedio un 20-35% de disminución en la concentración de ACTH tras un ciclo de congelación/descongelación. Los cambios observados después de otros tres ciclos de congelación/descongelación son mínimos.

* $g = (1118 \times 10^{-8})$ (radio en cm) $(rpm)^2$

Se realizó un estudio (n = 50) con tubos siliconizados y tubos no siliconizados. La media geométrica de los tubos siliconizados fue de 28,8 pg/mL (intervalo de 2 desviaciones estándar de 13,9-59,7). La media geométrica de los tubos no siliconizados fue de 26,7 pg/mL (intervalo de 2 desviaciones estándar de 12,4-57,5).

8. EQUIPO Y MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

8.1 12 tubos desechables de polipropileno o poliestireno de 75 mm

No deben emplearse tubos de vidrio de borosilicato.

8.2 Gradilla para tubos de ensayo

8.3 Contador gamma válido para yodo 125

8.4 Mezclador vórtex

8.5 Utensilios de dosificación:

- **a.** Micropipeta calibrada para suministrar 50 µL y 200 µL
- **b.** Dispensadores repetitivos calibrados para suministrar 50 µL, 200 µL y 1 mL
- **c.** Pipetas volumétricas para reconstituir controles y calibradores, 2 mL y 5 mL

8.6 Cilindro graduado de 500 mL

8.7 Parafilm o equivalente para cubrir los tubos de ensayo

8.8 Fórceps revestidos con teflón u otro dispositivo para distribuir glóbulos

8.9 Unidad de aspiración

8.10 Agua purificada para reconstituir componentes

9. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de utilizarlos.

9.1 Reconstitución de los calibradores / controles IRMA ACTH

- **a.** Extraiga los calibradores y controles liofilizados IRMA ACTH del refrigerador.
- **b.** Con una pipeta volumétrica, agregue 2 mL de agua purificada a los calibradores y controles IRMA ACTH. Igualmente, agregue 5 mL de agua desionizada o destilada al calibrador 0 ACTH.
- **c.** Golpee ligeramente los frascos para desalojar el pellet liofilizado y mezcle suavemente.
- **d.** A temperatura ambiente, gire los calibradores y controles durante 25-30 minutos o déjelos reposar mezclando con frecuencia hasta que el contenido se haya disuelto por completo. Mezcle bien antes de usar.
- **e.** La reconstitución finaliza cuando todas las soluciones adquieren un aspecto homogéneo.

9.2 Preparación de la solución de lavado IRMA ACTH

- **a.** El concentrado de la solución de lavado activa IRMA ACTH se diluye 10X en agua purificada para obtener una solución activa.

  Vacíe el frasco de 50 mL que contiene el concentrado en un cilindro graduado de 500 mL.
- **b.** A continuación enjuague el interior del frasco con agua purificada y agregue los restos del concentrado al cilindro de 500 mL.
- **c.** Continúe añadiendo agua purificada hasta alcanzar el volumen total del cilindro de 500 mL. Remueva para asegurar la completa disolución del material precipitado y obtener una mezcla uniforme. Identifique este material con la etiqueta Solución de lavado activa IRMA ACTH.

* g = (1118×10^{-8}) (radio en cm) $(rpm)^2$

9.3 Prepare y etiquete por duplicado 12 tubos de polipropileno/poliestireno de 17 mm.

Agregue reactivos a los tubos como sigue:

a. Calibrador 0
200 µL de calibrador 0
50 µL de trazador IRMA ACTH ^{125}I (rojo)

b. Calibradores (1-5)
200 µL de calibrador
50 µL de trazador IRMA ACTH ^{125}I (rojo)

c. Controles y muestras desconocidas
200 µL de muestra
50 µL de trazador IRMA ACTH ^{125}I (rojo)

9.4 Agite tres veces en vórtex la gradilla que contiene todos los tubos durante 1-2 segundos cada vez. No permita que se forme espuma en el contenido de los tubos.

9.5 Distribuya un glóbulo de IRMA ACTH en cada tubo utilizando fórceps revestidos con teflón o un dispensador adecuado para glóbulos (no emplee los dedos).

9.6 Cubra los tubos con parafilm o equivalente.

Incube los tubos durante 22 (±2) horas a 18-25°C. Registre la temperatura al principio y al final de la prueba.

. Después de la incubación de 20 (±2) horas, los tubos deben lavarse de este modo:

a. Aspire la mezcla de reacción en un recipiente adecuado para residuos radiactivos.

b. Lave los tubos con la solución de lavado activa IRMA ACTH.

Lave enérgicamente el glóbulo distribuyendo 1 mL de solución de lavado activa en cada tubo de ensayo con suficiente fuerza para impeler el glóbulo desde el fondo del tubo. Aspire después de cada etapa de lavado. Repita dos veces el procedimiento de lavado (tres lavados en total).

9.7 Mida la radiactividad presente en cada tubo utilizando un contador gamma. Cada tubo debe contarse durante 1 minuto o más (consulte el apartado Limitaciones del procedimiento).

10. COMENTARIOS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

10.1 Cuando agregue glóbulos a los tubos, incline levemente la gradilla de tubos de ensayo para que los glóbulos rueden dentro de los tubos. Así evitará que la solución de prueba salpique demasiado. No maneje los glóbulos con los dedos.

10.2 Con una pipeta, vierta trazador IRMA ACTH 125I en el tercio inferior del tubo de ensayo.

10.3 Las muestras cuya lectura sea superior al calibrador más alto deben diluirse con calibrador 0 y volverse a someter al ensayo.

10.4 Todas las muestras de paciente DEBEN conservarse en hielo hasta su análisis.

10.5 Para obtener resultados óptimos con el equipo los glóbulos deben lavarse cuidadosamente.

10.6 No se han observado desviaciones en ensayos de hasta 130 tubos.

10.7 Para que el laboratorio pueda supervisar completamente los resultados del ensayo IRMA debe comprobar otros factores. DiaSorin recomienda comprobar los siguientes parámetros para asegurar los resultados uniformes del equipo.

a. Unión máxima
Cuentas por minuto (CPM) del tubo de calibrador 5

b. Unión no específica
CPM del tubo de calibrador 0

11. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe incluir al menos un control de nivel alto y otro de nivel bajo en cada ensayo para supervisar sus resultados. Pueden utilizarse controles comercialmente disponibles o los tres controles de referencia que se suministran con el equipo. Los controles del equipo contienen ACTH en concentraciones típicas en pacientes de rango normal y elevado. Los controles del equipo se han probado con el equipo IRMA ACTH de DiaSorin. Los intervalos determinados por DiaSorin están impresos en los viales de control. Los controles utilizados deben tratarse como muestras desconocidas y analizarse por duplicado. El laboratorio debe mantener gráficos de control de calidad para llevar un seguimiento de los resultados de los controles. Los resultados de los controles deben analizarse con métodos estadísticos que evalúen las tendencias correctamente. Cada laboratorio debe establecer límites de resultado aceptables para cada nivel de control mediante métodos estadísticos diseñados para detectar errores sistemáticos y aleatorios. Los resultados de los controles deben cumplir los criterios de aceptabilidad del laboratorio antes de informar de los resultados de las pruebas con pacientes.[17-19]

12. CÁLCULO DE RESULTADOS

Para determinar la concentración de ACTH hallada en muestras desconocidas y de control, en cada ensayo se prepara una curva de calibrador utilizando las concentraciones indicadas en las etiquetas de los viales. Los valores de muestras desconocidas se generan como sigue:

12.1 Calcule el promedio de CPM de cada calibrador, control y muestra desconocida.

12.2 Usando papel milimetrado semilogarítmico, trace la CPM de cada nivel de calibrador en el eje de ordenadas (eje Y) con respecto a la concentración del calibrador del eje de abscisas (eje X).

NOTA: Para analizar los datos también pueden utilizarse programas automáticos de reducción de datos. DiaSorin utiliza Multi-Calc (Pharmacia) con un programa de ajuste suavizado SPLINE log-CPM. Todos los demás métodos de reducción de datos han de ser validados antes utilizarlos con regularidad.

12.3 Interpole los niveles de ACTH en las muestras del trazado.

12.4 Si la lectura de una muestra desconocida es superior a la del calibrador más alto, debe diluirse con calibrador 0 y volverse a someter al ensayo.

12.5 Si alguna muestra desconocida está diluida, corríjala hasta obtener el factor de dilución adecuado.

12.6 Los valores inferiores al calibrador 1 pero mayores que 1,5 pg/mL (sensibilidad del ensayo) pueden calcularse utilizando la fórmula:

$$\text{Valores de desconocida } \frac{\text{CPM (desconocida)}}{\text{CPM (cal. 1)}} \text{ x Valor de cal. 1}$$

12.7 El intervalo resultante del ensayo se encuentra dentro de la concentración del calibrador más alto y la sensibilidad del ensayo.

Datos de las muestras

La TABLA I y la figura 1 muestran datos típicos de muestras y una curva de calibrador IRMA ACTH; esta información sólo debe utilizarse como referencia y no para calcular ningún valor. Los datos se han generado con trazador nuevo.

Reducción de datos

El laboratorio de control de calidad de DiaSorin utiliza un ajuste de curva suavizada SPLINE.

TABLA I

Datos de muestras de IRMA ACTH de DiaSorin

Tubo	CPM duplicada	CPM media	Conc. (pg/mL)
Calibrador 0	563	577	
	591		
Calibradores (pg/mL)			
1 (9,9)	1.562	1.627	
	1,692		
2 (23,3)	3.348	3.367	
	3,385		
3 (96,1)	11.573	11.519	
	11,464		
4 (328)	35.676	35.551	
	35,426		
5 (1330)	104.713	102.148	
	99,583		
Muestras desconocidas			
1	3.999	4.132	30
	4,264		
2	13.668	12.831	109
	11,993		
3	41.418	41.488	387
	41,557		

EJEMPLO DE CURVA DE CALIBRADOR IRMA ACTH

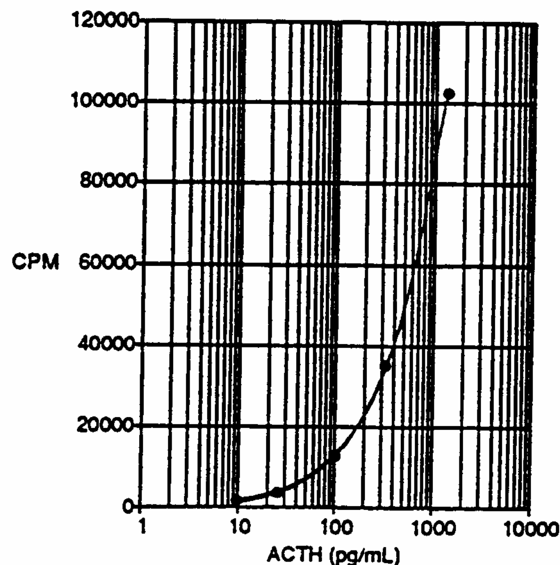


FIGURA 1

13. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

13.1 La frecuencia de las cuentas debería bastar para reducir errores estadísticos (por ejemplo, la acumulación de 2.000 CPM dará como resultado un error del 5%; 10.000 CPM dará como resultado un 1% de error).

13.3 Todos los resultados de ACTH deben interpretarse cuidadosamente con las presentaciones clínicas generales y otras pruebas de diagnóstico que los respalden.

14. VALORES PREVISTOS

DiaSorin Inc. recomienda que cada laboratorio de análisis establezca su propio intervalo de referencia (normal).

Intervalo normal

Cada laboratorio debe establecer su propio intervalo normal. DiaSorin ha establecido un intervalo normal a partir de 100 muestras congeladas de plasma con EDTA tomadas de voluntarios aparentemente sanos (50 mujeres, 50 hombres). Las muestras se tomaron entre las 7-10:00 a.m. a donantes en ayunas (toda la noche) y se guardaron en tubos no siliconizados. La media geométrica se calculó en 18,5 pg/mL con un intervalo de 2 desviaciones estándar de 6 a 56,7 pg/mL.

15. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL RESULTADO

15.1 Precisión

La precisión intraserie y total se determinó según el documento EP5-T2 del NCCLS. Se analizaron cuatro controles por duplicado durante doce días de trabajo en tres emplazamientos diferentes.

Precisión intraserie (valores = pg/mL)

Número de la muestra	Valor de la media	D.E.	% C.V.
1	32.7	1.37	4.20
2	58.0	2.05	3.53
3	194	4.90	2.53
4	773	41.97	5.43

Precisión total del ensayo (valores = pg/mL)
Se han combinado los datos de los tres emplazamientos.

Número de la muestra	Valor de la media	D.E.	% C.V.
1	32.7	1.88	5.8
2	62.0	6.15	9.9
3	194	9.04	4.7
4	817	87.6	10.7

DiaSorin evaluó la precisión inferior de este modo:

Precisión interserie (valores = pg/mL)
Las muestras se analizaron en 10 ensayos independientes.

Número de la muestra	Valor de la media	D.E.	% C.V.	n
1	8.65	0.496	5.74	10
2	10.67	0.527	4.94	10
3	257.0	8.126	3.16	10

Precisión intraensayo (valores = pg/mL)
Las muestras se analizaron en réplicas de 10 en un único ensayo.

Número de la muestra	Valor de la media	D.E.	% C.V.	n
1	8.6	0.411	4.78	10
2	10.39	0.437	4.21	10
3	260.7	9.22	3.54	10

15.2 Veracidad: la veracidad del ensayo se ha comprobado con la prueba de linealidad y la de recuperación.

Linealidad

Se diluyeron dos muestras con EDTA y un pool de muestras con EDTA con calibrador 0. Los resultados se resumen a continuación (valores = pg/mL).

Número de la muestra	Dilución	Medida	Corregida para dilución
1	No diluida	>Cal. E	
	1:2	755	1510
	1:4	.40	1360
	1:8	158	1264
	1:16	84	1344
	1:32	41	1312
	1:67	21	1344
	1:128	11	1408
2	No diluida	1239	
	1:2	644	1287
	1:4	336	1344
	1:8	158	1264
	1:16	80	1280
	1:32	37	1184
	1:67	20	1280
	1:128	9	1152
Pool	No diluida	>Cal. E	
	1:2	713	1426
	1:4	342	1368
	1:8	155	1240
	1:16	78	1248
	1:32	39	1248
	1:67	20	1280
	1:128	10	1380

Exactitud

Datos representativos de tres mezclas de muestras con ACTH 1-39 para determinar la recuperación, (valores = pg/mL).

Valor de fondo	ACTH añadida	Valor previsto	Valor medido	Porcentaje de recuperación
Pool 1 17.4	5 25 50 75 125 500	22.4 42.4 67.4 92.4 142.4 517.4	20.4 37.6 59.8 81.1 118.5 571.7	91.1 88.7 88.7 87.8 83.2 110.5
			Recuperación media	91.7
Pool 2 32.1	5 25 50 75 125 500	37.1 57.1 82.1 107.1 157.1 532.1	36.2 52.3 71.1 92.8 128.3 583.0	97.6 91.6 86.6 86.6 81.7 109.6
			Recuperación media	92.3
Pool 3 31.2	5 25 50 75 125 500	36.2 56.2 81.2 106.2 156.2 531.2	35.5 48.9 69.0 89.6 129.7 520.6	98.1 87.0 85.0 84.4 83.0 98.0
			Recuperación media	87.5

15.3 Sensibilidad analítica

La sensibilidad, definida como la concentración de ACTH medida con dos desviaciones estándar por encima de las cuentas del calibrador 0, es de 1,5 pg/mL o inferior con una unión mínima y trazador nuevo.

15.4 Especificidad y reactividad cruzada

La reactividad cruzada del IRMA ACTH se ha efectuado añadiendo las siguientes concentraciones de péptidos al calibrador bajo y al medio.

Péptido	Dosis (pg/mL)	Cambio en el calibrador medio (pg/mL)	% cambio	Cambio en el calibrador bajo (pg/mL)	% cambio
ACTH 1 - 26	100,000	-304.3	-82.9%	-35.3	-83.0%
	1,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	500	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	200	0.0	0.0%	0.0	0.0%
ACTH 18 - 24	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	50,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
ACTH 26 - 39	100,000	-358.4	-97.7%	-37.1	-87.3%
	5,000	-261.5	-71.3%	-35.0	-82.2%
	2,000	-169.4	-46.2%	-30.5	-71.6%
	1,000	-97.0	-26.4%	-21.5	-50.6%
	500	-45.0	-12.3%	-14.0	-33.0%
ACTH 1 - 10	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	50,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	1,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	500	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	200	0.0	0.0%	0.0	0.0%
α-MSH	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	1,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	500	0.0	0.0%	0.0	0.0%
β-MSH	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	50,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
β-Endorfina	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	50,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%

CONSULTE LA BIBLIOGRAFÍA EN LA ÚLTIMA PÁGINA.

ANALISI IMMUNORADIOMETRICA PER L'ORMONE ADRENOCORTICOTROPO

1. USO PREVISTO

SOLO PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*.

Questo kit serve per la determinazione quantitativa dell'ormone adrenocorticotropo umano (ACTH) nel plasma EDTA. La misurazione di ACTH nel plasma è utilizzata nella diagnosi delle disfunzioni surrenali.

2. SOMMARIO E SPIEGAZIONI

La misurazione di ACTH nel plasma umano riveste da molti anni notevole interesse clinico. Nel 1948 Sayers et. al. descrisse un metodo per la determinazione di ACTH in base alla sua bioattività.[1] Da allora sono state sviluppate analisi radioimmunologiche (RIA) per la misurazione di ACTH, basate tuttavia su un anticorpo primario che non rilevava l'attività biologica. L'analisi ACTH IRMA DiaSorin è ideata per rilevare l'intera molecola ACTH (1-39). ACTH IRMA è un metodo per il rilevamento di ACTH nel plasma più sensibile rispetto al RIA che consente una differenziazione più netta tra livelli normali e soppressi.[2]

ACTH è secreto dalle cellule adrenocorticotrope pituitarie del lobo anteriore della ghiandola pituitaria.[3] È sintetizzato come parte di una grande molecola precursore dell'amminoacido 265, POMC (proopiomelanocortina).[5] ACTH è un ormone amminoacido 39 con la seguente struttura:

NH_2-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe-OH.

La sequenza 1-13 è la stessa dell'ormone alfa-melanocita-stimolante. La sequenza 1-26 è ritenuta la parte attiva della molecola ed è necessaria per la completa attività biologica.[4]

La molecola ACTH è una proteina di base suscettibile all'azione degli enzimi proteolitici. Aumenta la sintesi e il rilascio di tutti i corticosteroidi surrenali dalla corteccia surrenale, compresi cortisolo, aldosterone e androgeni surrenali. I principali fattori che influiscono sul rilascio di ACTH comprendono CRH (ormone a rilascio di corticotropina), concentrazione plasmatica di cortisolo libero, stress e ciclo sonno-veglia. Il controllo della concentrazione di ACTH è mediato da un meccanismo di feedback negativo e dal sistema nervoso centrale. ACTH aumenta in risposta a riduzioni dei livelli plasmatici di cortisolo. Per contro, un aumento del cortisolo è associato all'inibizione del rilascio di ACTH a livello pituitario.[3]

ACTH viene secreto dalla ghiandola pituitaria in modo pulsatile, ma secondo un ritmo prioritario diurno. I livelli di ACTH in un individuo normale sono tipicamente più elevati nelle prime ore del mattino (6-8) e più bassi durante il giorno. Per questo motivo, il prelievo di sangue viene normalmente eseguito al mattino. Le condizioni che disturbano il normale ritmo diurno comprendono la sindrome di Cushing, la sindrome ACTH ectopico e stress fisiologico, ad esempio associato a interventi chirurgici.[6-8]

Congiuntamente ad altre analisi diagnostiche, i risultati di ACTH servono per la valutazione di pazienti con diverse patologie a carico della corteccia surrenale. La sindrome di Cushing è un disturbo metabolico determinato da un'aumentata produzione di cortisolo da parte della ghiandola surrenale. La diagnosi della sindrome di Cushing dipende dalla dimostrazione di un'aumentata produzione di cortisolo e dalla mancata soppressione di dexametasone. Una volta stabilita la diagnosi, vengono eseguiti ulteriori test per determinarne la causa.[3,9,10] Questa sindrome è generalmente causata da iperplasia surrenale, subordinata a una sovrapproduzione di ACTH pituitario. La sovrapproduzione di cortisolo è dovuta a ipersecrezione di ACTH pituitario o produzione ectopica di ACTH da tumori non endocrini.

Il termine “morbo di Cushing” è tradizionalmente usato per definire un individuo affetto da tumore pituitario associato a produzione di ACTH; tuttavia, alcuni clinici ricorrono a questa definizione per descrivere un individuo con ipersecrezione di ACTH pituitario indipendentemente dalla presenza di un tumore.

Se la sindrome di Cushing è causata da una secrezione eccessiva di ACTH pituitario, è possibile un aumento dei livelli di ACTH. Il sito di produzione di ACTH nei microadenomi corticotropi è stato localizzato utilizzando la tecnica della cateterizzazione sinusale petrosale inferiore bilaterale.[11,12]

La sindrome da ACTH ectopico è un'altra possibile causa della sindrome di Cushing. In questi pazienti, i tumori maligni non endocrini producono livelli elevati di ACTH e POMC, che determinano a loro volta una produzione elevata di cortisolo non soggetto a inibizione di feedback a nessun
livello.[13,14]
Quando la sindrome di Cushing è dovuta a un'anomalia surrenale primaria, come un tumore surrenale, la funzionalità della ghiandola surrenale è indipendente dai livelli di ACTH e la secrezione pituitaria è soppressa. Questi pazienti presentano concentrazioni molto basse o addirittura non rilevabili di ACTH e i test di soppressione di dexametasone o stimolazione di metirapone non evidenziano alcuna risposta.[3]
L'insufficienza surrenale è una condizione che porta a una produzione di cortisolo inadeguata. Può essere dovuta a un'incapacità primaria della ghiandola surrenale di produrre quantità sufficienti di cortisolo o a un'insufficienza secondaria dovuta a una produzione di ACTH inadeguata. La concentrazione basale di ACTH nei pazienti con insufficienza adrenocorticale primaria (morbo di Addison) sarà significativamente elevata. La somministrazione di ACTH endogeno non determina in questi pazienti alcuna risposta da parte delle ghiandole surrenali. L'insufficienza surrenale secondaria è causata da deficienza di ACTH pituitario. I livelli plasmatici di ACTH possono contribuire a distinguere tra insufficienza surrenale primaria e secondaria, poiché sono elevati nella prima e ridotti o assenti nella seconda.[3]
La sindrome di Nelson è una condizione causata dallo sviluppo di tumori surrenali di grandi dimensioni in pazienti che hanno subito interventi di adrenalectomia bilaterale per la sindrome di Cushing. In questi pazienti vengono tipicamente monitorati i livelli di ACTH quale misura ausiliaria di monitoraggio del normale decorso clinico e della risposta ai regimi terapeutici.[15,16]

3. PRINCIPIO DELL'ANALISI

ACTH IRMA DiaSorin è un'analisi immunoradiometrica ad elevata specificità e sensibilità per la misurazione di ACTH umano 1-39. L'analisi è eseguita utilizzando due anticorpi ACTH specifici per le diverse regioni della molecola di ACTH. Il tracciante iodurato utilizzato in questo sistema contiene un anticorpo di capra policlonale purificato specifico per ACTH 26-39 e un anticorpo monoclonale etichettato con iodio-125 specifico per ACTH 1-17. Quando i campioni vengono incubati con il tracciante e granuli di polistirene rivestiti con anticorpo di topo anti-capra, gli anticorpi ACTH specifici si legano all'ACTH presente nel campione. Solo ACTH La forma 1-39 presente nel campione si legherà ad ambedue gli anticorpi formando un complesso. La radioattività libera viene eliminata mediante lavaggio e la radioattività presente sul granulo viene misurata. Le concentrazioni di ACTH presenti nei campioni sono direttamente proporzionali alla radioattività misurata. Per il calcolo dei risultati si confrontano i valori CPM di ogni campione con i valori CPM dei calibratori ACTH inclusi nel kit.

4. REAGENTI FORNITI CON IL KIT

Calibratore 0 ACTH IRMA	1 fiala/ 50 mL	1 fiala/ 5,0 mL
Calibratori ACTH IRMA (1-5)	5 fiale/2,0 mL	5 fiale/2,0 mL
Granuli ACTH IRMA	1 contenitore/ 65 granuli	2 contenitori/ 65 granuli
Tracciante ACTH IRMA	2 fiale/2 mL	4 fiale/2 mL
Soluzione di lavaggio ACTH IRMA	1 fiala/ 50 mL	1 fiala/ 50 mL
Controlli ACTH IRMA (livelli 1-3)	1 fiala/2,0 mL	3 fiale/2,0 mL
Numero di test	65	130

CONSERVAZIONE: Il kit deve essere conservato a 2-8°C. Dopo l'apertura, conservare ogni reagente a 2-8° fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta, salvo diversamente specificato. I reagenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza. La data di scadenza del kit è indicata sull'etichetta esterna e si riferisce alla data di scadenza del tracciante.

Durante la ricostituzione del contenuto delle fiale, mescolare delicatamente al fine di evitare la formazione di schiuma. Conservare tutti i reagenti ricostituiti secondo le raccomandazioni seguenti. Non si devono mescolare reagenti di lotti diversi.

4.1 Calibratori ACTH IRMA (0-5): reagente liofilizzato
Serie di 6 calibratori ACTH (1-39) sintetici, a concentrazioni variabili da 0 a 1500 pg/mL, in plasma umano esente da ACTH con stabilizzanti e sodio azide (0,1%) aggiunto come conservante. I valori esatti della concentrazione vengono indicati per ogni lotto. I calibratori sono calibrati utilizzando ACTH umano sintetico (1-39). L'ACTH umano sintetico purificato con HPLC è stato testato e trovato reattivo all'ACTH umano sintetico (1-39) ottenuto dal National Hormone and Pituitary Program (University of Maryland). I calibratori del kit dimostrano commutabilità con i campioni del paziente se usati con reagenti e con la procedura operativa di questo test diagnostico *in vitro*, secondo le raccomandazioni pertinenti. Ricostituire ogni fiala con 2,0 2.0 mL di acqua purificata. A temperatura ambiente, ruotare i calibratori per 25 - 30 minuti o lasciarli riposare per 60 e mescolare con frequenza fino a quando il contenuto è completamente disciolto. Mescolare accuratamente prima dell'uso. Conservare i calibratori ricostituiti come segue:
Per periodi fino a cinque giorni: conservare a 2-8°C.
Per periodi prolungati (scadenza del kit) tra ogni singolo utilizzo: conservare a -15°C o temperatura inferiore.
È possibile congelare e scongelare i calibratori (incluso il calibratore 0) fino a un massimo di tre volte. È possibile tenere i calibratori a temperatura ambiente per un massimo di quattro intervalli di 1 ora durante la conservazione a 2-8°C.

4.2 Granuli ACTH IRMA: reagente pronto per l'uso
Granuli in polistirene rivestiti con anticorpo di topo anti-capra.

4.3 Tracciante ^{125}I ACTH IRMA: reagente pronto per l'uso
Ogni fiala contiene 2 mL di anti-ACTH di capra policlonale e ^{125}I di anti-ACTH monoclonale di topo etichettato diluito in siero tamponato contenente colorante rosso e sodio azide (0,1%).

4.4 Concentrato per soluzione di lavaggio ACTH IRMA: soluzione liquida
Contiene un surfattante tamponato concentrato. Preparare una soluzione di lavaggio diluendo il contenuto dell'intera fiala fino a ottenere un volume finale di 500 mL con acqua distillata o deionizzata.

4.5 Controllo ACTH IRMA, livelli 1-3: reagente liofilizzato
Nel siero umano si aggiungono le quantità necessarie di ACTH umano sintetico, sodio azide (0,1%) e altri stabilizzanti. Ricostituire ogni fiala con 2,0 mL di acqua purificata. A temperatura ambiente, ruotare i controlli per 25-30 minuti oppure lasciarli riposare mescolando con frequenza per 60 minuti fino a quando il contenuto non è

completamente disciolto. Mescolare accuratamente prima dell'uso. Trattare ogni controllo come campione non noto. I valori per ogni lotto sono stampati sulle fiale dei controlli. Conservare i controlli ricostituiti come segue:

Per periodi fino a 5 giorni: conservare a 2-8°C.

Per periodi prolungati (scadenza del kit) tra ogni singolo utilizzo: conservare a -15°C o a temperatura inferiore.

È possibile congelare e scongelare i controlli fino a un massimo di tre volte. È possibile tenere i controlli a temperatura ambiente per un massimo di quattro intervalli di 1 ora durante la conservazione a 2-8°C.

5. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

SOLO PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*.

Non per uso interno o esterno su animali o persone.

REAGENTI CONTENENTI MATERIALE DI PROVENIENZA UMANA

Trattare come potenzialmente infettivi.

Ogni unità di siero/plasma da donatore usata nella preparazione di questo prodotto è stata testata con una metodica approvata dalla FDA statunitense e trovata non reattiva per la presenza di HBsAg, anticorpi ad HCV ed anticorpi ad HIV 1/2. Anche se questi metodi sono estremamente accurati, non è garantita la localizzazione di tutte le unità infette. Questo prodotto può inoltre contenere altro materiale di provenienza umana per il quale non esiste un test approvato. Poiché nessuna metodologia di test approvata può offrire garanzia completa sull'assenza del virus dell'epatite B (HBV), dell'epatite C (HCV), del virus di immunodeficienza (HIV) o di altri agenti infettivi, tutto il materiale di provenienza umana deve essere trattato in conformità con le buone pratiche di laboratorio adottando le precauzioni appropriate come descritto nei manuali dei Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," quarta edizione, Maggio 1999 o edizione corrente.

REAGENTI CONTENENTI SODIO AZIDE

ATTENZIONE: Alcuni reagenti di questo kit contengono sodio azide. La sodio azide può reagire con componenti in piombo o rame e formare quindi azidi metalliche altamente esplosive. Al momento dello smaltimento, lavare con abbondante acqua al fine di evitare la formazione di azide. Per ulteriori informazioni, consultare "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," nel manuale Guide-Safety Management No. CDC-22 pubblicato dai Centri per il controllo e la Prevenzione delle malattie di Atlanta, GA,

Frasi di rischio per sostanze pericolose della Comunità Europea (Direttiva del Consiglio 1999/45/CE)

R 20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed (Dannoso per inalazione, per contatto con la pelle ed ingestione).

R 32 - Contact with acids liberates very toxic gas (Il contatto con acidi libera gas altamente tossico).

S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water (Dopo il contatto con la pelle, lavare immediatamente con abbondante acqua).

REAGENTI CONTENENTI IODIO-125

Questo kit contiene materiale radioattivo che non supera 7,2 µCi (266kBq) di iodio-125. Adottare precauzioni adeguate e le buone pratiche di laboratorio per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento di questo materiale. Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza generale: Questo materiale radioattivo può essere consegnato, acquisito, conservato e usato unicamente da personale medico, veterinari abilitati alla pratica di medicina veterinaria, laboratori clinici o ospedali e unicamente per test *in vitro* clinici o di laboratorio che non prevedano la somministrazione interna o esterna del materiale, o di radiazioni da esso derivanti, su persone o animali. L'acquisto,

il possesso, la conservazione, l'uso e il trasferimento sono soggetti alle norme e alla licenza generale della Nuclear Regulatory Commission statunitense dello stato con cui la Commissione ha stipulato un accordo per l'esercizio dell'autorità normativa.

1. La conservazione del materiale radioattivo deve essere limitata ad un'area specificatamente designata.
2. L'accesso ai materiali radioattivi deve essere limitato esclusivamente al personale autorizzato.
3. Non usare la bocca per versare con la pipetta materiale radioattivo.
4. Non mangiare o bere nelle aree di lavoro designate per materiale radioattivo.
5. Le zone dove possono verificarsi perdite devono essere pulite, quindi lavate con detergente alcalino o soluzione per la decontaminazione radiologica. Tutti gli oggetti in vetro usati devono essere accuratamente risciacquati con acqua prima di lavarli con altri oggetti in vetro del laboratorio.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza specifica: L'acquisto, l'uso, il trasferimento e lo smaltimento di materiali radioattivi sono soggetti alle norme e alle condizioni della licenza specifica.

AVVERTENZA: Questo prodotto contiene un prodotto chimico noto nello Stato della California per provocare cancro.

ATTENZIONE: La radioattività stampata sulle istruzioni allegate alla confezione può essere leggermente diversa dalla radioattività stampata sull'etichetta della scatola e sull'etichetta della fiala di tracciante. L'etichetta sulla scatola e sulla fiala di tracciante indicano la quantità effettiva di radioattività alla data di calibrazione, mentre il materiale informativo della confezione indica la radioattività teorica del kit.

6. INDICAZIONI DI POSSIBILE DETERIORAMENTO DEI REAGENTI DEL KIT

6.1 Uno sfasamento nella pendenza o posizione della curva di calibrazione rispetto a quella che normalmente si ottiene.

6.2 Una diminuzione del legame massimo.

6.3 Un legame zero altamente non specifico.

6.4 Valori non soddisfacente dei duplicati.

7. RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE DEL PLASMA

Sono richiesti quattrocento microlitri di plasma EDTA, in due serie, da usare per l'analisi ACTH IRMA. I campioni eparinizzati non devono essere usati nell'analisi ACTH IRMA. È bene evitare l'uso di campioni emolizzati, lipemici o itterici.

Il sangue deve essere prelevato in maniera asettica mediante venopuntura in una provetta sotto vuoto EDTA da 5 o 10 mL. Mescolare il campione capovolgendolo delicatamente e collocarlo immediatamente su ghiaccio tritato. Centrifugare il campione entro 30 minuti dalla raccolta. Centrifugare per 15 minuti usando circa 1500 x g*. Rimuovere immediatamente il plasma dalle cellule utilizzando una pipetta di plastica e trasferire in una provetta di polipropilene/polistirene. Conservare i campioni di plasma a 2-8°C prima dell'analisi, che deve essere eseguita entro 4 ore. Qualora non fosse possibile analizzare i campioni entro 4 ore, è necessario conservarli a -20°C. I campioni possono essere conservati a 2-8°C fino a un massimo di 4 ore o a –20°C fino a un massimo di 6 mesi.

NOTA: Gli studi DiaSorin eseguiti su campioni freschi evidenziano una diminuzione media delle concentrazioni di ACTH pari al 20-35% dopo uno scongelamento.

Sono state osservate variazioni minime dopo tre scongelamenti consecutivi.

È stato eseguito uno studio (n = 50) confrontando provette siliconate e provette non siliconate. La media geometrica per le provette siliconate è risultata essere di 28,8 pg/mL (range 2SD 13,9-59,7). La media geometrica per le provette non siliconate è risultata essere di 26,7 pg/mL (range 2SD 12,4-57,5).

* g = (1118 x 10^{-8}) (raggio in cm) $(rpm)^2$

8. ATTREZZATURE E MATERIALI NECESSARI, NON FORNITI IN DOTAZIONE

8.1 Provette in polipropilene o polistirene monouso, 12 x 75 mm.
Le provette in vetro borosilicato non possono essere usate.

8.2 Rack provette.

8.3 Contatore a raggi gamma adatto per il conteggio di iodio-125.

8.4 Centrifugatore.

8.5 Dispositivi per operazioni con pipetta:

- **a.** Micropipetta calibrata per erogare 50 µL e 200 µL.
- **b.** Dosatori a ripetizione, calibrati per erogare 50 µL, 200 µL e 1 mL.
- **c.** Pipette volumetriche per la ricostituzione dei controlli e dei calibratori; 2,0 mL e 5,0 mL.

8.6 Cilindro graduato da 500 mL.

8.7 Pellicola o equivalente per coprire le provette.

8.8 Forcipe rivestito in teflon o altro accessorio per distribuire i granuli.

8.9 Unità di aspirazione.

8.10 Acqua purificata per la ricostituzione dei componenti.

9. PROCEDURA DI ANALISI

Lasciare che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente prima dell'uso.

9.1 Ricostituzione dei calibratori e / controlli ACTH IRMA

- **a.** Togliere i calibratori e i controlli ACTH IRMA dal frigorifero.
- **b.** Utilizzando una pipetta volumetrica, aggiungere 2,0 mL di acqua purificata ai calibratori e controlli ACTH IRMA. Analogamente, aggiungere 5,0 mL di acqua deionizzata o distillata al calibratore 0 ACTH.
- **c.** Percuotere delicatamente i flaconi per staccare i grumi liofilizzati e mescolare.
- **d.** A temperatura ambiente, ruotare i calibratori e i controlli per 25 - 30 minuti o lasciarli riposare mescolando con frequenza per 60 minuti fino a quando il contenuto non è completamente disciolto. Mescolare accuratamente prima dell'uso.
- **e.** La ricostituzione è completa quando tutte le soluzioni appaiono omogenee.

9.2 Preparazione della soluzione di lavaggio ACTH IRMA.
Il concentrato per soluzione di lavaggio ACTH IRMA viene diluito (concentrato 10 volte) in acqua purificata per ottenere una soluzione efficace.

- **a.** Svuotare il flacone da 50 mL contenente il concentrato in un cilindro graduato da 500 mL.
- **b.** Dopo l'aggiunta, sciacquare il contenuto del flacone con acqua purificata e aggiungerlo al concentrato nella siringa da 500 mL.
- **c.** Portare il volume finale della siringa da 500 mL a 500 mL aggiungendo continuamente acqua purificata. Agitare fino a quando il materiale precipitato non è completamente disciolto e mescolare fino ad ottenere una soluzione omogenea. Etichettare il materiale come soluzione di lavaggio ACTH IRMA.

9.3 Preparare due serie di provette in polipropilene/polistirene da 12 x 17 mm etichettate in modo appropriato.

Aggiungere i reagenti nelle provette come indicato di seguito:

a. Calibratore 0
200 µL di calibratore 0
50 µL ^{125}I tracciante ACTH IRMA (rosso)

b. Calibratori (1-5)
200 µL di calibratore
50 µL ^{125}I tracciante ACTH IRMA (rosso)

c. Controlli e campioni non noti
200 µL di campione
50 µL ^{125}I tracciante ACTH IRMA (rosso)

9.4 Centrifugare il rack contenente tutte le provette tre volte per 1-2 secondi ciascuna. Evitare la formazione di schiuma nelle provette.

9.5 Distribuire un granulo ACTH IRMA in ogni provetta utilizzando un forcipe rivestito in teflon o un dosatore adatto (non utilizzare le dita).

9.6 Coprire le provette con pellicola o equivalente.

Lasciare in incubazione le provette per 20 (±2) ore a 18-25°C. Registrare la temperatura all'inizio e al termine dell'analisi.

. Al termine del periodo di incubazione di 20 (±2) ore, lavare le provette come descritto di seguito:

a. Aspirare la miscela in un contenitore per rifiuti radioattivi.

b. Lavare ciascuna provetta con la soluzione per lavaggio ACTH IRMA.

Lavare energicamente i granuli versando 1 mL di soluzione di lavaggio in ogni provetta con una forza sufficiente a sollevare i granuli dal fondo della provetta. Aspirare dopo ogni fase di lavaggio. Ripetere la procedura di lavaggio due volte per un totale di tre lavaggi.

9.7 Misurare la radioattività presente in ogni provetta utilizzando un contatore a raggi gamma. Ogni provetta deve essere contata per un 1 minuto o un intervallo superiore (vedere la sezione: Limiti della procedura).

10. COMMENTI ALLA PROCEDURA

10.1 Quando si versano i granuli nelle provette, inclinare leggermente il portaprovette e far scivolare i granuli nelle provette. In questo modo si evita di far schizzare la soluzione di test. Non maneggiare i granuli con le dita.

10.2 Con la pipetta, aggiungere il tracciante 125I ACTH IRMA al terzo inferiore della provetta di analisi.

10.3 I campioni con lettura superiore al calibratore massimo devono essere diluiti con il calibratore 0 e sottoposti a una nuova analisi.

10.4 Tutti i campioni del paziente DEVONO essere mantenuti su ghiaccio fino all'esecuzione dell'analisi.

10.5 Per ottenere prestazioni ottimali del kit, è necessario lavare accuratamente i granuli.

10.6 Nessuno scostamento è stato osservato in analisi fino a 130 provette.

10.7 Per monitorare completamente le prestazioni di un'analisi IRMA, è possibile controllare altri fattori. DiaSorin consiglia di eseguire un controllo dei seguenti parametri per garantire prestazioni costanti del kit.

a. Legame massimo
Conteggi al minuto (CPM) della provetta del calibratore "5"

b. Legame non specifico
CPM della provetta del calibratore 0

11. CONTROLLO DI QUALITA'

Ogni laboratorio deve includere almeno un controllo a livello basso e un controllo a livello alto in ogni analisi per monitorare le prestazioni. Si possono utilizzare i controlli disponibili in commercio o i tre controlli di riferimento forniti con il kit. I controlli del kit contengono ACTH a concentrazioni tipiche di range paziente normali o elevati. I controlli del kit sono stati esaminati utilizzando il kit ACTH IRMA DiaSorin. I range determinati da DiaSorin sono stampati sulle fiale dei controlli. I controlli devono essere considerati come campioni non noti e analizzati in duplice copia. Conservare le tabelle per il controllo della qualità al fine di verificare le performance dei controlli. I risultati dei controlli devono essere analizzati con metodi statistici che consentano un'adeguata valutazione dei trend. Limiti accettabili per le performance verranno stabiliti da ogni singolo laboratorio per ogni livello di controllo utilizzando metodi basati su statistiche ideati per rilevare errori sistematici e casuali. I risultati dei controlli devono corrispondere ai criteri del laboratorio per quanto concerne l'accettabilità prima di riferire i risultati dei test ai pazienti.[17-19]

12. CALCOLO DEI RISULTATI

Per stabilire la concentrazione di ACTH trovato in campioni di controllo e non noti, creare una curva calibratore per ogni analisi utilizzando le concentrazioni del calibratore indicate sulle etichette delle fiale. I valori per campioni non noti sono ottenuti come segue:

12.1 Calcolare il CPM medio per ogni calibratore, controllo e campione non noto.

12.2 Usando una carta millimetrata per modello log-lineare, tracciare l'esatto CPM del livello di ogni calibratore sull'asse delle ordinate (asse Y) e la concentrazione del calibratore sull'asse delle ascisse (asse X).

NOTA: Si possono usare programmi di riduzione automatica dei dati per analizzare i dati. DiaSorin utilizza Multi-Calc (Pharmacia) con un programma a curva uniforme rispetto al CPM logaritmico. Alti metodi di riduzione dei dati devono essere convalidati prima di includerli nell'uso regolare.

12.3 Interpolare i livelli di ACTH nei campioni dal tracciato.

12.4 Se un campione non noto dà una lettura maggiore rispetto al calibratore superiore, il campione dovrà essere diluito con il calibratore 0 e analizzato nuovamente.

12.5 Se un campione non noto è stato diluito, correggere con il fattore di diluizione idoneo.

12.6 I valori inferiori al Calibratore 1 ma superiori a 1,5 pg/mL (sensibilità dell'analisi) possono essere stimati usando la seguente formula:

$$\text{Valori non noti} \quad \frac{\text{CPM (non noto)}}{\text{CPM (Ca1. 1)}} \times \text{valore Cal. 1}$$

12.7 Il range registrabile dell'analisi rientra nella concentrazione del calibratore superiore e nella sensibilità dell'analisi.

Dati campione

I dati di campioni tipici e una curva di calibratore per ACTH IRMA sono riportati nella TABELLA I e nella Figura 1; queste informazioni servono solo a scopo di riferimento e non devono essere usate per il calcolo dei valori. I dati sono stati generati con tracciante fresco.

Riduzione dei dati

Il Laboratorio di controllo di qualità DiaSorin QC utilizza una retta curvilinea uniforme.

TABELLA I
Dati campione ACTH IRMA DiaSorin

Provetta	Doppia serie CPM	Media CPM	Conc. (pg/mL)
Calibrator 0	563	577	
	591		
Calibratori (pg/mL)			
1 (9.9)	1,562	1,627	
	1,692		
2 (23.3)	3,348	3,367	
	3,385		
3 (96.1)	11,573	11,519	
	11,464		
4 (328)	35,676	35,551	
	35,426		
5 (1330)	104,713	102,148	
	99,583		
Campioni non noti			
1	3,999	4,132	30
	4,264		
2	13,668	12,831	109
	11,993		
3	41,418	41,488	387
	41,557		

CURVA CALIBRATORE CAMPIONE ACTH IRMA

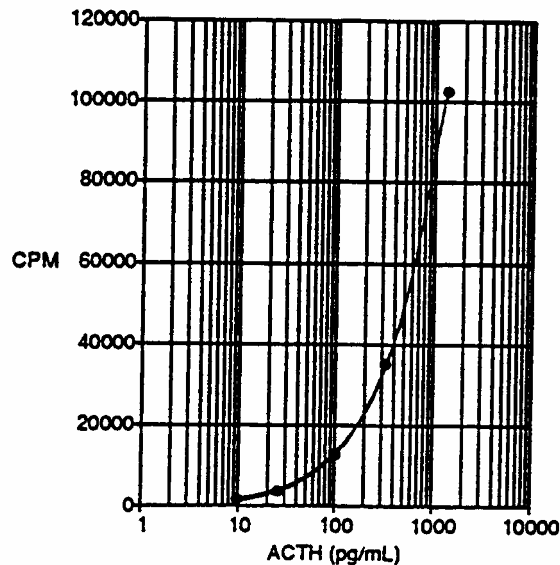


Figura 1

13. Limiti della procedura

13.1 Il conteggio delle volte dovrebbe essere sufficiente per prevenire errori statistici (ad esempio, l'accumulo di 2.000 conteggi produrrà un errore del 5%; 10.000 conteggi produrranno un errore dell'1%).

13.3 Tutti i risultati ACTH devono essere accuratamente interpretati con le presentazioni cliniche generali e altre prove diagnostiche di supporto.

14. VALORI PREVISTI

DiaSorin Inc. consiglia ad ogni laboratorio di stabilire un proprio range di riferimento (normale).

Range normale

Ogni laboratorio deve stabilire un range di riferimento proprio. Un range normale è stato definito da DiaSorin usando 100 campioni di plasma EDTA congelati prelevati da volontari apparentemente sani (50 femmine, 50 maschi). I campioni sono stati prelevati in provette non siliconate nell'orario 7-10:00 da donatori a digiuno. La media geometrica è risultata essere di 18,5 pg/mL con un range 2 S.D. di 6,0 - 56,7 pg/mL.

15. CARATTERISTICHE SPECIFICHE DELLE PERFORMANCE

15.1 Precisione

La precisione intra-analisi e la precisione totale sono state determinate secondo le linee guida EP5-T2 del documento NCCLS. Ognuno dei tre siti ha analizzato quattro controlli in doppia serie in dodici giorni operativi.

Precisione intra-analisi (valori = pg/mL).

Numero campione	Valore medio	D.S.	(% C.V.)
1	32.7	1.37	4.20
2	58.0	2.05	3.53
3	194	4.90	2.53
4	773	41.97	5.43

Precisione totale dell'analisi (valori = pg/mL).
Sono stati combinati i dati provenienti da tre siti.

Numero campione	Valore medio	D.S.	(% C.V.)
1	32.7	1.88	5.8
2	62.0	6.15	9.9
3	194	9.04	4.7
4	817	87.6	10.7

DiaSorin ha inoltre valutato la precisione "low end" come segue:

Precisione inter-analisi (valori = pg/mL).
Ogni campione è stato analizzato con 10 analisi separate.

Numero campione	Valore medio	D.S.	(% C.V.)	n
1	8.65	0.496	5.74	10
2	10.67	0.527	4.94	10
3	257.0	8.126	3.16	10

Precisione intra-analisi (valori = pg/mL).
Ogni campione è stato analizzato in 10 serie nell'ambito di una singola analisi.

Numero campione	Valore medio	D.S.	(% C.V.)	n
1	8.6	0.411	4.78	10
2	10.39	0.437	4.21	10
3	260.7	9.22	3.54	10

15.2 Accuratezza: l'accuratezza dell'analisi è stata controllata mediante test di linearità e test di recupero.

Linearità

Due campioni EDTA e un pool EDTA sono stati diluiti con il calibratore 0. I risultati sono riepilogati di seguito (valori = pg/mL).

Numero campione	Diluizione	Misurato	Corretto per diluizione
1	Non diluito	>E Cal.	
	1:2	755	1510
	1:4	.40	1360
	1:8	158	1264
	1:16	84	1344
	1:32	41	1312
	1:67	21	1344
	1:128	11	1408
2	Non diluito	1239	
	1:2	644	1287
	1:4	336	1344
	1:8	158	1264
	1:16	80	1280
	1:32	37	1184
	1:67	20	1280
	1:128	9	1152
Pool	Non diluito	>E Cal.	
	1:2	713	1426
	1:4	342	1368
	1:8	155	1240
	1:16	78	1248
	1:32	39	1248
	1:67	20	1280
	1:128	10	1380

Precisione

Dati rappresentativi dei tre campioni di pool di siero sono stati combinati con ACTH 1-39 per determinare i recuperi (valori = pg/mL).

Valore di fondo	ACTH aggiunto	Valore previsto	Valore misurato	Percentuale di recupero
Pool 1 17.4	5 25 50 75 125 500	22.4 42.4 67.4 92.4 142.4 517.4	20.4 37.6 59.8 81.1 118.5 571.7	91.1 88.7 88.7 87.8 83.2 110.5
			Media Recupero	91.7
Pool 2 32.1	5 25 50 75 125 500	37.1 57.1 82.1 107.1 157.1 532.1	36.2 52.3 71.1 92.8 128.3 583.0	97.6 91.6 86.6 86.6 81.7 109.6
			Media Recupero	92.3
Pool 3 31.2	5 25 50 75 125 500	36.2 56.2 81.2 106.2 156.2 531.2	35.5 48.9 69.0 89.6 129.7 520.6	98.1 87.0 85.0 84.4 83.0 98.0
			Media Recupero	87.5

15.3 Sensibilità analitica

La sensibilità, definita come concentrazione di ACTH misurata in corrispondenza di due deviazioni standard al di sopra dei conteggi del calibratore 0 con legame massimo, è pari o inferiore a 1,5 pg/mL, con tracciante fresco.

15.4 Specificità e reattività incrociata

La reattività incrociata dell'analisi ACTH IRMA è stata eseguita con le seguenti concentrazioni di peptidi aggiunte sia a un calibratore basso che a un calibratore medio.

Peptide	Dose (pg/mL)	Variazione calibratore medio(pg/mL)	% variazione	Variazione calibratore basso (pg/mL)	% variazione
ACTH 1 - 26	100,000	-304.3	-82.9%	-35.3	-83.0%
	1,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	500	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	200	0.0	0.0%	0.0	0.0%
ACTH 18 - 24	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	50,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
ACTH 26 - 39	100,000	-358.4	-97.7%	-37.1	-87.3%
	5,000	-261.5	-71.3%	-35.0	-82.2%
	2,000	-169.4	-46.2%	-30.5	-71.6%
	1,000	-97.0	-26.4%	-21.5	-50.6%
	500	-45.0	-12.3%	-14.0	-33.0%
ACTH 1 - 10	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	50,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	1,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	500	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	200	0.0	0.0%	0.0	0.0%
α-MSH	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	1,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	500	0.0	0.0%	0.0	0.0%
β-MSH	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	50,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
β-Endorfina	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	50,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%

FARE RIFERIMENTO ALL'ULTIMA PAGINA PER LA BIBLIOGRAFIA

ENSAIO IMUNORADIOMÉTRICO DA HORMONA ADRENOCORTICOTRÓPICA

1. USO INDICADO

APENAS PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO* .

Este kit destina-se à determinação quantitativa da hormona adrenocorticotrópica humana (ACTH) no plasma EDTA. A medição da ACTH no plasma é utilizada para o diagnóstico de disfunções da adrenal.

2. RESUMO E EXPLICAÇÃO

A medição da ACTH no plasma humano é alvo de grande interesse clínico há muitos anos. Em 1948 Sayers et. al. descreveram um método para determinar a ACTH com base na sua bioactividade.[1] Desde essa época, desenvolveram-se radioimunoensaios (RIA) de medição da ACTH, os quais se baseavam num anticorpo primário que não media a actividade biológica. O ensaio imunoradiométrico da ACTH da DiaSorin foi concebido para detectar a molécula total ACTH (1-39). O ensaio imunoradiométrico da ACTH é um método mais sensível de detecção da ACTH no plasma do que os radioimunoensaios, permitindo estabelecer uma maior diferenciação entre os níveis normais e os níveis de supressão da ACTH.[2]

A ACTH é um produto secretório das células adrenocorticotrópicas pituitárias situadas dentro da glândula pituitária anterior.[3] É sintetizada enquanto componente de uma molécula POMC (proopiomelanocortina) precursora grande de 265 aminoácidos.[5] A ACTH é uma hormona de 39 aminoácidos com a estrutura seguinte:

NH_2-Ser-Tir-Ser-Met-Glu-His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-Pro-Val-Lis-Val-Tir-Pro-Asn-Gli-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-Glu-Ala-Fe-Pro-Leu-Glu-Fe-OH.

A sequência 1-13 é semelhante à da hormona estimulante alfa-melanocita. A sequência 1-26 é considerada como a porção activa da molécula sendo essencial para uma actividade biológica completa.[4]

A molécula ACTH é uma proteína básica e lábil à acção de enzimas proteolíticas. Funciona aumentando a síntese e a libertação de todos os corticosteróides adrenais do córtex adrenal incluindo o cortisol, a aldosterona e os andrógenios adrenais. Os principais factores que têm efeito sobre a libertação da ACTH incluem a CRH (hormona libertadora da corticotropina), a concentração de cortisol livre no plasma, o stress e o ciclo do sono. O controlo da concentração de ACTH é mediado por um mecanismo de resposta negativa e pelo sistema nervoso central. A ACTH aumenta em resposta a reduções dos níveis de cortisol no plasma. Inversamente, à medida que o cortisol aumenta, a libertação de ACTH é inibida ao nível da pituitária.[3]

A ACTH é segregada pela glândula pituitária de uma forma pulsátil mas seguindo um ritmo diurno excessivo. Os níveis de ACTH no indivíduo normal são tipicamente mais elevados durante a madrugada (6-8 da manhã) e mais reduzidos ao final do dia. Devido a este facto, é habitual efectuar recolhas de sangue da ACTH de manhã, bem cedo. As condições consideradas como sendo perturbadoras do ritmo diurno normal incluem a síndrome de Cushing, a síndrome da ACTH ectópica e o stress fisiológico, como o decorrente de uma cirurgia .[6-8]

Os resultados da ACTH são utilizados em conjunção com outros ensaios de diagnóstico para avaliar pacientes com diversas doenças envolvendo o córtex adrenal. A síndrome de Cushing é uma desordem metabólica resultante de uma produção excessiva de cortisol pela glândula adrenal. O diagnóstico da síndrome de Cushing depende da demonstração da produção excessiva de cortisol e da falta de supressão da dexametasona. Depois de estabelecer o diagnóstico, será necessário efectuar mais testes para determinar a sua causa.[3,9,10] Esta síndrome é habitualmente provocada pela hiperplasia adrenal, derivada da produção excessiva da ACTH pituitária. A produção excessiva de cortisol fica a dever-se à hipersecreção da ACTH pituitária ou à produção ectópica da ACTH por parte dos tumores não endócrinos.

O termo “Doença de Cushing” é tradicionalmente utilizado para definir um indivíduo que possua um tumor pituitário produtor da ACTH; no entanto, é utilizado por alguns médicos para descrever alguém que sofra de uma hipersecreção da ACTH pituitária independentemente da presença de um tumor.

Quando a síndrome de Cushing é provocada pela secreção excessiva da ACTH pituitária, pode ocorrer um aumento da ACTH. O local de produção da ACTH nos microadenomas corticotróficos foi localizado utilizando a técnica da cateterização sinusal petrosa inferior bilateral.[11,12]

A síndrome da ACTH ectópica é outra causa possível da síndrome de Cushing. Nestes pacientes, os tumores malignos não endócrinos produzem níveis mais elevados da ACTH e da POMC, os quais resultam numa produção muito elevada de cortisol que não está sujeita à inibição da resposta a qualquer
nível.[13,14]

Quando a síndrome de Cushing se fica a dever a uma anormalidade adrenal primária, tal como um tumor adrenal, a glândula adrenal age de forma independente da ACTH e a secreção pituitária é suprimida. Estes pacientes têm concentrações muito baixas ou indetectáveis da ACTH, não sendo visível qualquer resposta com a supressão da dexametasona ou com os testes de supressão da dexametasona ou de estimulação da metirapona.[3]

A insuficiência adrenal é uma condição que conduz a uma produção inadequada de cortisol. Pode ficar a dever-se a uma incapacidade primária da adrenal de produzir quantidades suficientes de cortisol ou a falhas secundárias provocadas por uma produção insuficiente da ACTH. A concentração da ACTH basal nos pacientes com insuficiência adrenocortical primária (doença de Addison) será marcadamente elevada. Quando é administrada ACTH endógena a estes pacientes, não é obtida qualquer resposta por parte das adrenais. A insuficiência adrenal secundária é provocada pela deficiência da ACTH pituitária. Os níveis da ACTH no plasma podem ajudar a distinguir entre a insuficiência adrenal primária e secundária, dado que são elevados na primeira e reduzidos ou ausentes na segunda.[3]

A síndrome de Nelson é uma condição provocada pelo desenvolvimento de grandes tumores pituitários em pacientes que se tenham submetido a uma adrenalectomia bilateral relacionada com a síndrome de Cushing. Os níveis da ACTH são habitualmente seguidos nesses pacientes para ajudar a monitorizar o percurso clínico e a resposta aos regimes terapêuticos.[15,16]

3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O IRMA ACTH da DiaSorin é um ensaio imunoradiométrico altamente específico e sensível para a medição da ACTH 1-39 humana. A medição é obtida utilizando dois anticorpos da ACTH, cada qual específico de diferentes regiões da molécula ACTH. O traçador iodato usado neste sistema contém um anticorpo de cabra policlonal purificado, específico para a ACTH 26-39 e um anticorpo monoclonal rotulado com iodo-125 específico para a ACTH 1-17. Quando as amostras são incubadas com o traçador e com as esférulas de polistireno revestidas a anti-cabra de rato, os anticorpos específicos da ACTH ligam-se à ACTH presente na amostra. Só a ACTH 1-39 presente na amostra ficará ligada a ambos os anticorpos para formar um complexo anticorpo. A radioactividade não ligada é eliminada e a radioactividade ligada à esférula é medida. As concentrações da ACTH presentes na amostra são directamente proporcionais à radioactividade medida. Os resultados são calculados comparando os CPM de cada amostra com os CPM dos calibradores da ACTH incluídos neste kit.

4. REAGENTES FORNECIDOS NO KIT

Calibrador 0 IRMA ACTH	1 frasco/5.0 mL	1 frasco/5.0 mL
Calibradores IRMA ACTH (1-5)	5 frascos/ 2.0 mL	5 frascos/ 2.0 mL
Esférulas IRMA ACTH	1 recipiente/ 65 esférulas	2 recipientes/ 65 esférulas
Traçador IRMA ACTH	2 frascos/ 2 mL	4 frascos/ 2 mL
Solução de lavagem IRMA ACTH	1 frasco/50 mL	1 frasco/50 mL
Controlos (Níveis 1-3) IRMA ACTH	3 frascos/ 2.0 mL	3 frascos/ 2.0 mL
Número de testes	65	130

ARMAZENAMENTO: Ao ser recebido, o kit deve ser armazenado a 2-8°C. Depois de abrir, armazene cada reagente a 2-8°, a menos que mencionado em contrário abaixo, até ao prazo de validade indicado no rótulo. Os reagentes não devem ser usados após o prazo de validade. O prazo de validade do kit é indicado no rótulo externo e corresponde ao prazo de validade do traçador.

Ao reconstituir o conteúdo dos frascos, misture com cuidado para evitar a formação de espuma. Guarde todos os reagentes reconstituídos tal como recomendado abaixo. Não misture reagentes de lotes diferentes.

4.1 Calibradores (0-5) IRMA ACTH: reagente liofilizado

Conjunto de seis calibradores sintéticos ACTH (1-39), em concentrações com intervalos de 0-1500 pg/mL, em plasma humano livre de ACTH com estabilizadores e 0,1% de azida de sódio adicionada como conservante. Os valores exactos de concentração são atribuídos a cada lote. Os calibradores são calibrados relativamente à ACTH humana sintética (1-39). A ACTH humana sintética purificada em HPLC foi testada e considerada como reagindo de forma equivalente à ACTH humana sintética (1-39) obtida no Programa Nacional de Hormonas e da Pituitária (Universidade de Maryland). Os calibradores do kit demonstram permutabilidade com amostras do paciente quando usados com reagentes e um procedimento operacional deste teste de diagnóstico *in vitro* tal como recomendado. Reconstitua cada frasco com 2.0 mL de água purificada. À temperatura ambiente, faça a rotação dos calibradores durante 25 - 30 minutos ou deixe-os descansar durante 60 minutos misturando frequentemente até o conteúdo estar completamente dissolvido. Misture bem antes de usar. Guarde os calibradores reconstituídos da seguinte forma:
Períodos até 5 dias: Armazene a 2-8°C.
No caso de armazenamento prolongado (prazo de validade do kit) entre usos: Armazene a -15°C ou a temperaturas inferiores.
Os calibradores (incluindo o calibrador 0) podem ser congelados e cortados um máximo de três vezes. Os calibradores podem ser mantidos à temperatura ambiente um máximo de quatro intervalos de 1 hora, durante o seu armazenamento a 2-8°C.

4.2 Esférulas IRMA ACTH: reagente pronto a usar

As esférulas de polistireno estão revestidas com anticorpo policlonal anti-cabra de rato.

4.3 ^{125}I Traçador IRMA ACTH: reagente pronto a usar

Cada frasco contém 2 mL de anti-ATCH de cabra policlonal e ^{125}I anti-ATCH de rato monoclonal diluído em soro tamponado com corante vermelho e 0,1% de azida de sódio.

4.4 Concentrado de solução de lavagem IRMA ACTH: solução líquida

Contém um surfactante concentrado tamponado. Prepare uma solução de lavagem de trabalho diluindo todo o conteúdo do frasco num volume final de 500 mL com água destilada ou deionizada.

4.5 Controlo IRMA ACTH IRMA, Níveis 1-3: reagente liofilizado

O plasma humano é enriquecido com a quantidade adequada da ACTH humana sintética. São adicionados 0.1% de azida de sódio e outros estabilizantes. Reconstitua cada frasco com 2.0 mL de água purificada. À temperatura ambiente, faça a rotação dos controlos durante 25-30 minutos ou deixe-os descansar durante 60 segundos, misturando frequentemente até o conteúdo estar completamente dissolvido. Misture bem
antes de usar. Trate cada controlo como se fosse uma amostra desconhecida. Os

valores de cada lote estão impressos nos frascos do controlo. Armazene os controlos reconstituídos da seguinte forma:
Períodos até 5 dias: Armazene a 2-8°C.
Para um armazenamento prolongado (prazo de validade do kit) entre usos: Armazene a -15°C ou a temperaturas inferiores.
Os controlos podem ser congelados e cortados um máximo de três vezes. Os controlos podem ser mantidos à temperatura ambiente um máximo de quatro intervalos de 1 hora durante o armazenamento a 2-8°C.

5. AVISOS E PRECAUÇÕES

APENAS PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO* .
Não recomendado para o uso interno ou externo em seres humanos ou animais.

REAGENTES COM MATERIAL DE FONTE HUMANA

Trate como se fossem potencialmente infecciosos.

Cada unidade de doador de soro/plasma usados na preparação deste produto foi testado por um método aprovado pela FDA e determinado como sendo não reactivo para a presença de HBsAg, anticorpo para HCV e anticorpo para HIV 1/2. Embora estes métodos sejam bastante precisos, não garantem que todas as unidades infectadas sejam detectadas. Este produto também pode conter outros materiais de origem humana para os quais não há teste aprovado. Como nenhum método de teste conhecido pode oferecer segurança total em relação à ausência do vírus da hepatite B (HBV), do vírus da hepatite C (HCV), do vírus HIV ou de outros agentes infecciosos, todos os produtos que contêm materiais de origem humana devem ser manuseados de acordo com boas práticas laboratoriais usando as precauções adequadas tal como descrito no Manual dos Centros Americanos para Controlo e Prevenção de Doenças e Institutos Nacionais de Saúde, “Biosegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos,” (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories),” 4ª ed., Maio de 1999 ou edição actual.

REAGENTES COM AZIDA DE SÓDIO

CUIDADO: Alguns reagentes presentes neste kit contêm azida de sódio. A azida de sódio pode reagir com chumbo ou cobre para formar azidas de metal altamente explosivo. Ao eliminar, lave com grande quantidade de água para impedir a formação de azida. Para mais informações, consulte “Descontaminação de drenos de pias de laboratórios para remover sais de azidas,” no Manual Guia-Gestão de Segurança Nº CDC-22 emitido pelos Centros de Controlo e Prevenção de Doenças, Atlanta, GA, 1976.

Frases de Risco de Substâncias Perigosas da Comunidade Europeia (Directiva do Conselho 1999/45/EC)
R20/21/22 - Nocivo pela inalação, em contacto com a pele e se ingerido.
R32 - O contacto com ácidos liberta gás muito tóxico.
S28 - Após contacto com a pele, lave imediatamente com água em abundância.

REAGENTES COM IODO-125

Este kit contém material radioactivo que não excede 7.2 µCi (266 kBq) de iodo-125. Devem ser tomadas todas as precauções apropriadas e usadas boas práticas laboratoriais no armazenamento, manuseamento e eliminação deste material. Para médicos ou clínicas que recebem rádio-isótopos sob uma licença geral: Este material radioactivo pode ser recebido, adquirido, possuído e usado apenas por médicos, veterinários na prática da medicina veterinária, laboratórios clínicos e hospitais, e apenas para testes laboratoriais ou testes clínicos *in vitro* que não envolvam administração interna ou externa do material, ou a radiação deste para seres humanos ou animais. A sua recepção, aquisição, posse, uso e transferência estão sujeitos aos regulamentos e à licença geral da Comissão Reguladora Nuclear dos Estados Unidos do estado com o qual a Comissão entrou em acordo para o exercício da autoridade reguladora.

1. O armazenamento de qualquer material radioactivo deve ser limitado a uma área especificamente designada.
2. O acesso a materiais radioactivos deve ser limitado apenas a pessoal autorizado.
3. Não pipete material radioactivo por via oral.
4. Não coma nem beba nas áreas designadas para trabalho radioactivo.
5. As áreas onde possam ocorrer fugas devem ser limpas e lavadas com detergente álcali ou solução de descontaminação radiológica. Qualquer vidro usado deve ser enxaguado completamente em água antes de lavar qualquer outro material de vidro do laboratório.

Para médicos ou instituições que recebem rádio-isótopos sob uma licença específica: A recepção, uso, transferência e eliminação de materiais radioactivos estão sujeitos aos regulamentos e condições de sua licença específica.

ADVERTÊNCIA: Este produto contém um elemento químico que provoca cancro, segundo o Estado da Califórnia.

ATENÇÃO: O símbolo de radioactividade impresso na embalagem pode ser ligeiramente diferente do símbolo impresso no rótulo da caixa e no rótulo do frasco do traçador. O rótulo da caixa e do frasco do traçador indicam a quantidade real de radioactividade na data de calibragem enquanto a embalagem indica a radioactividade teórica no kit.

6. INDICAÇÕES DE POSSÍVEL DETERIORAÇÃO DOS REAGENTES DO KIT

6.1 Um deslocamento na inclinação ou na posição da curva do calibrador em relação à que é normalmente obtida.

6.2 Uma diminuição na ligação máxima.

6.3 Uma ligação zero não específica alta.

6.4 Valores duplicados pequenos.

7. RECOLHA DE ESPÉCIMES E PREPARAÇÃO DO PLASMA

São necessários quatrocentos microlitros de plasma EDTA para ensaiar o espécime em duplicado com o IRMA ACTH. Não utilize amostras heparinadas com o IRMA ACTH. Evite o uso de amostras puramente ictéricas, hemolisadas ou lipémicas.

O sangue deve ser recolhido assepticamente por venipunctura num tubo Vacutainer EDTA de 5 ou 10 mL. Misture a amostra invertendo-a ligeiramente e coloque imediatamente em gelo aos pedaços. Centrifugue a amostra nos 30 minutos seguintes à recolha. A centrifugação deve ser efectuada durante 15 minutos usando aproximadamente 1500 x g*. Separe imediatamente o plasma das células utilizando uma pipeta de plástico e transfira para um tubo de polipropileno/polistireno. Guarde as amostras de plasma a 2-8°C antes do ensaio, desde que este possa ser efectuado nas 4 horas seguintes. Se as amostras não puderem ser ensaiadas nesse período de 4 horas, deverão ser armazenadas a -20°C. As amostras podem ser armazenadas a 2-8°C durante 4 horas ou a –20°C durante um período máximo de 6 meses.

NOTA: Estudos efectuados pela DiaSorin em amostras recentemente recolhidas demonstraram uma diminuição média de 20-35% nas concentrações de ACTH após um corte congelado. Foram observados alterações mínimas nos três cortes congelados subsequentes.

Foi efectuado um estudo (n = 50) utilizando tubos com silicone e tubos sem silicone. A média geométrica dos tubos com silicone foi de 28.8 pg/mL (intervalo de 2 D.S. entre 13.9-59.7). A média geométrica dos tubos sem silicone foi de 26.7 pg/mL (intervalo de 2 D.S. entre 12.4-57.5).

* g = (1118×10^{-8}) (raio em cm) $(rpm)^2$

8. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

8.1 Tubos descartáveis de polipropileno ou de polistireno, 12 x 75 mm.
Não utilize tubos de vidro de borosilicato.

8.2 Suporte do tubo de ensaio.

8.3 Contador gama capaz de contar iodo-125.

8.4 Misturador de vórtice.

8.5 Dispositivos para pipetar:

- **a.** Micropipetador calibrado para administrar 50 µL e 200 µL.
- **b.** Distribuidores de repetição, calibrados para administrar 50 µL, 200 µL e 1 mL.
- **c.** Pipetas volumétricas para reconstituir controlos e calibradores; 2.0 mL e 5.0 mL.

8.6 Cilindro graduado de 500 mL.

8.7 Parafilme ou equivalente para cobrir os tubos de ensaio.

8.8 Fórceps revestido a teflon ou outro dispositivo aprovado para deitar esférulas.

8.9 Unidade de aspiração.

8.10 Água purificada para reconstituição dos componentes.

9. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

Permita que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente antes de utilizar.

9.1 Reconstituição dos Calibradores / Controlos do IRMA ACTH

- **a.** Retire os calibradores e os controlos liofilizados do IRMA ACTH do frigorífico.
- **b.** Utilizando uma pipeta volumétrica, adicione 2.0 mL de água purificada aos calibradores e controlos do IRMA ACTH. Adicione igualmente 5.0 mL de água destilada ou deionizada ao calibrador ACTH 0.
- **c.** Bata levemente nos frascos para deslocar a pastilha liofilizada e misture gentilmente.
- **d.** À temperatura ambiente, faça a rotação dos calibradores e dos controlos durante 25 - 30 minutos ou deixe-os em descanso misturando frequentemente durante 60 minutos até o respectivo conteúdo estar totalmente dissolvido. Misture bem antes de usar.
- **e.** A reconstituição estará concluída quando todas as soluções parecerem homógeneas.

9.2 Preparação da Solução de Lavagem IRMA ACTH.

O concentrado de solução de lavagem de trabalho IRMA ACTH é diluído 10X em água purificada para obter uma solução robusta de trabalho.

- **a.** Esvazie o frasco de 50 mL com o concentrado num cilindro graduado de 500 mL.
- **b.** Depois de adicionar, enxague o conteúdo do frasco com água purificada e acrescente o enxaguamento do concentrado ao cilindro de 500 mL.
- **c.** Atinja o volume final do cilindro de 500 mL continuando a adicionar água purificada até atingir os 500 mL. Agite para se certificar que há uma dissolução completa de qualquer material precipitado e uma mistura uniforme. Rotule este material como Solução de Lavagem de Trabalho IRMA ACTH.

9.3 Prepare tubos de polipropileno/polistireno de 12 x 17 mm devidamente rotulados, em duplicado.

Adicione reagentes aos tubos da seguinte forma:

a. Calibrador 0
Calibrador 0 de 200 µL
Traçador IRMA ACTH^{125}I (vermelho) de 50 µL

b. Calibradores (1-5)
Calibrador de 200 µL
Traçador IRMA ACTH^{125}I (vermelho) de 50 µL

c. Controlos e amostras desconhecidas
Amostra de 200 µL
Traçador IRMA ACTH ^{125}I (vermelho) de 50 µL

9.4 Agite o suporte com todos os tubos três vezes durante 1-2 segundos cada. Não permita a formação de espuma no conteúdo do tubo.

9.5 Deite uma esférula do IRMA ACTH em cada tubo com o fórceps revestido a Teflon ou com um doseador adequado para o manuseamento de esférulas. (Não utilize os dedos.)

9.6 Cubra os tubos com parafilme ou equivalente.

Incube os tubos durante 20 (±2) horas a 18-25°C. Registe a temperatura no início e no final do ensaio.

. Após o período de incubação de 20 (±2) horas, os tubos devem ser lavados da forma descrita a seguir:

a. Aspire a mistura da reacção para um recipiente adequado para desperdícios radioactivos.

b. Lave cada tubo com a Solução de Lavagem de Trabalho IRMA ACTH.

Lave a esférula deitando vigorosamente 1 mL de solução de lavagem de trabalho em cada tubo de ensaio com força suficiente para levantar a esférula do fundo do tubo de ensaio. Aspire depois de cada passo de lavagem. Repita o procedimento de lavagem duas vezes durante um total de três lavagens.

9.7 Meça a radioactividade presente em cada tubo usando um contador gama. Os tubos devem ser contados durante 1 minuto ou mais (consulte a secção LImitações do Procedimento).

10. COMENTÁRIOS SOBRE O PROCEDIMENTO

10.1 Ao adicionar esférulas aos tubos, incline levemente o suporte do tubo de ensaio e deixe as esférulas rolarem para dentro dos tubos. Evitará a ocorrência de respingos excessivos da solução de teste. Não manipule as esférulas com os dedos.

10.2 Pipete traçador 125I IRMA ACTH para o terço inferior do tubo de ensaio.

10.3 As amostras com leituras superiores ao calibrador mais alto devem ser diluídas com Calibrador 0 e novamente ensaiadas.

10.4 Todas as amostras do paciente DEVEM ser mantidas em gelo até serem ensaiadas.

10.5 Para obter um desempenho óptimo do kit, deverá lavar bem as esférulas.

10.6 Não se verificou qualquer desvio nos ensaios com um máximo de 130 tubos.

10.7 Para um laboratório monitorizar completamente o desempenho de um IRMA, há três factores adicionais a serem verificados. A DiaSorin sugere a verificação dos parâmetros seguintes para assegurar um desempenho consistente do kit.

a. Ligação máxima
Contagens por minuto (CPM) do Tubo do calibrador “5”)

b. Ligação não específica
CPM do Tubo do calibrador 0

11. CONTROLO DE QUALIDADE

Cada laboratório deve incluir pelo menos um controlo alto e um controlo baixo em cada ensaio, para monitorizar o desempenho do ensaio. Podem ser utilizados controlos comercialmente disponíveis ou os 3 controlos de referência fornecidos com o kit. Os controlos do kit contêm ACTH em concentrações habituais dos intervalos normais e dos intervalos altos dos pacientes. Os controlos do kit foram ensaiados utilizando o kit IRMA ACTH da DiaSorin. Os intervalos determinados pela DiaSorin estão impressos nos frascos dos controlos. Os controlos utilizados devem ser tratados como se fossem amostras desconhecidas e ensaiados em duplicado. Devem ser mantidas tabelas de controlo da qualidade por parte do laboratório para acompanhar o desempenho dos controlos. Os resultados dos controlos devem ser analisados através de métodos estatísticos que avaliem de forma adequada as tendências. Os limites de um desempenho aceitável devem ser determinados pelo laboratório individual para cada nível de controlo utilizando métodos baseados em estatísticas, concebidos para detectar erros sistemáticos e aleatórios. Os resultados do controlo devem estar em conformidade com os critérios de aceitabilidade do laboratório antes de relatar os resultados dos testes dos pacientes.[17-19]

12. CÁLCULO DE RESULTADOS

Para determinar a concentração de ACTH presente nas amostras desconhecidas e de controlo, é preparada uma curva do calibrador em cada ensaio utilizando as concentrações do calibrador indicadas nos rótulos dos frascos. Os valores das amostras desconhecidas são gerados da seguinte forma:

12.1 Calcule o CPM médio para cada calibrador, controlo e amostra desconhecida.

12.2 Usando papel de gráfico log-linear, marque o CPM de cada nível do calibrador na ordenada (eixo Y) em relação à concentração do calibrador na abcissa (eixo X).

NOTA: Também podem ser utilizados programas automatizados de redução de dados para analisar os dados. A DiaSorin utiliza Multi-Calc (Pharmacia) com um programa de ajuste SPLINE suave com registo do CPM. Os outros métodos de redução de dados devem ser validados antes de serem utilizados regularmente.

12.3 Interpole os níveis da ACTH nas amostras do gráfico.

12.4 Se uma amostra desconhecida apresentar leituras superiores ao calibrador mais alto, deverá ser diluída com calibrador 0 e novamente ensaiada.

12.5 Se tiver diluído uma amostra desconhecida, corrija para o factor de diluição apropriado.

12.6 Os valores inferiores ao Calibrador 1 mas superiores a 1.5 pg/mL (sensibilidade do ensaio) podem ser estimados utilizando a fórmula:

$$\text{Valores do desconhecido} \quad \frac{\text{CPM (desconhecido)}}{\text{CPM (Cal. 1)}} \times \text{Valor do Cal. 1}$$

12.7 O intervalo relatável do ensaio está situado dentro da concentração do calibrador mais alto e da sensibilidade do ensaio.

Dados da amostra

Os dados típicos da amostra e a curva do calibrador para o IRMA ACTH são apresentados na TABELA I e na Figura 1; esta informação serve apenas como referência e não deverá ser utilizada para o cálculo de qualquer valor. Estes dados foram gerados com traçador novo.

Redução de dados

O Laboratório de controlo de qualidade da DiaSorin usa um ajuste de curva spline suave.

TABELA I

Dados da amostra IRMA ACTH DiaSorin

Tubo	CPM duplicado	CPM médio	Conc. (pg/mL)
Calibrador 0	563	577	
	591		
Calibradores (pg/mL)			
1 (9.9)	1,562	1,627	
	1,692		
2 (23.3)	3,348	3,367	
	3,385		
3 (96.1)	11,573	11,519	
	11,464		
4 (328)	35,676	35,551	
	35,426		
5 (1330)	104,713	102,148	
	99,583		
Amostras desconhecidas			
1	3,999	4,132	30
	4,264		
2	13,668	12,831	109
	11,993		
3	41,418	41,488	387
	41,557		

CURVA DE CALIBRAGEM DA AMOSTRA IRMA ACTH

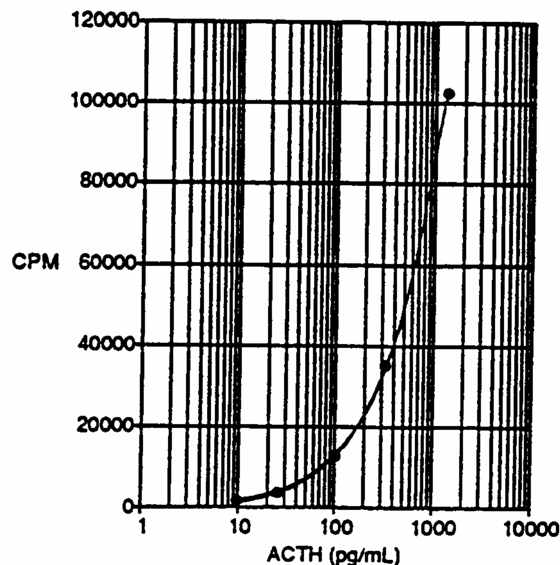


FIGURA 1

13. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

13.1 Os tempos de contagem devem ser os suficientes para reduzir os erros estatísticos (por exemplo, a acumulação de 2,000 contagens produzirá um erro de 5%; 10,000 contagens produzirão um erro de 1%).

13.3 Todos os resultados da ACTH devem ser interpretados cuidadosamente, tendo em consideração estudos clínicos gerais e outros testes diagnósticos auxiliares.

14. VALORES ESPERADOS

A DiaSorin Inc. recomenda que cada laboratório de testes estabeleça o seu próprio intervalo (normal) de referência.

Intervalo normal

Cada laboratório deve estabelecer o seu próprio intervalo normal. Foi estabelecido um intervalo normal pela DiaSorin utilizando 100 amostras congeladas de plasma EDTA de voluntários aparentemente saudáveis (50 do sexo feminino, 50 do sexo masculino). As amostras foram recolhidas em tubos sem silicone, entre as 7 e as 10 da manhã de doadores em jejum (durante a noite). A média geométrica foi calculada como sendo de 18.5 pg/mL com um intervalo de 2 D.S. entre 6.0 e 56.7 pg/mL.

15. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

15.1 Precisão

A precisão dentro do ensaio e a precisão total foram determinadas utilizando o Documento EP5-T2 da NCCLS. Cada um de três locais procederam ao ensaio de quatro controlos em duplicado durante um período de doze dias úteis.

Precisão no ensaio (valores = pg/mL).

Número da amostra	Valor médio	Desvio padrão	(% C.V.)
1	32.7	1.37	4.20
2	58.0	2.05	3.53
3	194	4.90	2.53
4	773	41.97	5.43

Precisão do Ensaio Total (valores = pg/mL).
Os dados foram combinados a partir de três locais.

Número da amostra	Valor médio	Desvio padrão	(% C.V.)
1	32.7	1.88	5.8
2	62.0	6.15	9.9
3	194	9.04	4.7
4	817	87.6	10.7

A precisão do limite inferior foi ainda calculada pela DiaSorin da seguinte forma:

Precisão Entre Ensaios (valores = pg/mL).
Cada amostra foi ensaiada em 10 ensaios individuais.

Número da amostra	Valor médio	Desvio padrão	(% C.V.)	n
1	8.65	0.496	5.74	10
2	10.67	0.527	4.94	10
3	257.0	8.126	3.16	10

Precisão no Ensaio (valores = pg/mL).
Cada amostra foi ensaiada como 10 réplicas num único ensaio.

Número da amostra	Valor médio	Desvio padrão	(% C.V.)	n
1	8.6	0.411	4.78	10
2	10.39	0.437	4.21	10
3	260.7	9.22	3.54	10

15.2 Precisão: A precisão do ensaio foi verificada através do teste da linearidade e do teste de recuperação.

Linearidade

Procedeu-se à diluição de duas amostras enriquecidas com EDTA e um conjunto enriquecido com EDTA em calibrador 0. Os resultados encontram-se descritos abaixo, (valores = pg/mL).

Número da amostra	Diluição	Medida	Corrigida para diluição
1	Não diluído	>E Cal.	
	1:2	755	1510
	1:4	.40	1360
	1:8	158	1264
	1:16	84	1344
	1:32	41	1312
	1:67	21	1344
	1:128	11	1408
2	Não diluído	1239	
	1:2	644	1287
	1:4	336	1344
	1:8	158	1264
	1:16	80	1280
	1:32	37	1184
	1:67	20	1280
	1:128	9	1152
Conjunto	Não diluído	>E Cal.	
	1:2	713	1426
	1:4	342	1368
	1:8	155	1240
	1:16	78	1248
	1:32	39	1248
	1:67	20	1280
	1:128	10	1380

Precisão

Os dados representativos de três amostras agrupadas foram enriquecidos com ACTH 1-39 para determinar as recuperações, (valores = pg/mL).

Valor base	ACTH Adicionado	Valor esperado	Valor medido	Percentagem de recuperação
Conjunto 1 17.4	5 25 50 75 125 500	22.4 42.4 67.4 92.4 142.4 517.4	20.4 37.6 59.8 81.1 118.5 571.7	91.1 88.7 88.7 87.8 83.2 110.5
			Recup. Média	91.7
Conjunto 2 32.1	5 25 50 75 125 500	37.1 57.1 82.1 107.1 157.1 532.1	36.2 52.3 71.1 92.8 128.3 583.0	97.6 91.6 86.6 86.6 81.7 109.6
			Recup. Média	92.3
Conjunto 3 31.2	5 25 50 75 125 500	36.2 56.2 81.2 106.2 156.2 531.2	35.5 48.9 69.0 89.6 129.7 520.6	98.1 87.0 85.0 84.4 83.0 98.0
			Recup. Média	87.5

15.3 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade, definida como a concentração da ACTH, mediu dois desvios padrão acima das contagens do calibrador 0, com uma ligação mínima de 1.5 pg/mL ou inferior, com traçador novo.

15.4 Especificidade e Reactividade Cruzada

A reactividade cruzada do IRMA ACTH foi feita com as seguintes concentrações de péptidos adicionadas ao calibrador baixo e ao calibrador médio.

Péptido	Dose (pg/mL)	Alteração no Calibrador médio (pg/mL)	% alteração	Alteração no Calibrador baixo (pg/mL)	% alteração
ACTH 1 - 26	100,000	-304.3	-82.9%	-35.3	-83.0%
	1,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	500	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	200	0.0	0.0%	0.0	0.0%
ACTH 18 - 24	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	50,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
ACTH 26 - 39	100,000	-358.4	-97.7%	-37.1	-87.3%
	5,000	-261.5	-71.3%	-35.0	-82.2%
	2,000	-169.4	-46.2%	-30.5	-71.6%
	1,000	-97.0	-26.4%	-21.5	-50.6%
	500	-45.0	-12.3%	-14.0	-33.0%
ACTH 1 - 10	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	50,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	1,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	500	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	200	0.0	0.0%	0.0	0.0%
α-MSH	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	1,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	500	0.0	0.0%	0.0	0.0%
β-MSH	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	50,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
β-Endorfina	100,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%
	50,000	0.0	0.0%	0.0	0.0%

CONSULTE A ÚTIMA PÁGINA PARA OBTER REFERÊNCIAS

REFERENCES/BIBLIOGRAPHIE/LITERATUR/BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAFIA/ REFERÊNCIAS

1. Sayers, M.A., G. Sayers and L.A. Woodbury, "The Assay of Adrenocorticotropic Hormone by the Adrenal Ascorbic Acid-Depletion Method," **Endocrinology,** 42:379-393, (1948).
2. Findlings, J.W., W.C. Engeland and H. Raff, "The Use of Immunoradiometric Assay for the Measurement of ACTH in Human Plasma," **TEM,** Elsevier Science Publishing Co., Inc., (1990).
3. **Harrison's Principles of Internal Medicine,** 11th edition, ACTH Physiology.
4. Mains, R.E., B.A. Eipper and N. Ling, "Common Precursor to Corticotropins and Endorphins," **Proceedings of the National Academy of Sciences,** U.S.A., 74: 3014 - 3018, (1977).
5. Orth, D.N., "Adrenocorticotropic Hormone," **Methods of Hormone Radioimmunoassay,** Second Edition, (1979).
6. Reader, S.C.J., J. Alaghband-Zadeh, R. Daly and W.R. Robertson, "Negative, Rate-sensitive Feedback Effects on Adrenocorticotropin Secretion by Cortisol in Normal Subjects," **The Journal of Endocrinology,** 92:443, (1982).
7. Tietz, N.W., eds, **Clinical Guide to Laboratory Tests,** W.B. Saunders Company (Philadelphia), (1990).
8. Krieger, D.T., "Factors Influencing the Circadian Periodicity of ACTH and Corticosteroids," **The Medical Clinics of North America,** 62:251, (1978).
9. Kuhn, J.M., M.F. Proeschel, D.J. Seurin, et. al., "Comparative Assessment of ACTH and Lipotropin Plasma Levels in the Diagnosis and Follow-up of Patients with Cushing's Syndrome: A Study of 210 Cases," **The American Journal of Medicine,** 86:678-684, (1989).
10. Hermus, A.R., G.F. Pieters, A.G. Smals, et. al., "Transition from Pituitary-Dependent to Adrenal-Dependent Cushing's Syndrome," **New England Journal of Medicine,** 318:966, (1988).
11. Landolt, A., A. Valavanis, J. Girard and An. Eberle, "Corticotrophin-Releasing Factor Test Used with Bilateral, Simultaneous Inferior Petrosal Sinus Blood Sample for the Diagnosis of Pituitary-Dependent Cushing's Disease," **Clinical Endo-crinology,** 25:687, (1986).
12. Findling, J.W. and J.B. Tyrrell, "Occult Ectopic Secretion of Corticotropin," **Archives of Internal Medicine,** 146:929, (1986).
13. Singer, W., N. Kovacs and E. Horvath, "Ectopic ACTH Syndrome: Clinicopathological Correlations," **The Journal of the Association of Clinical Pathologists,** 31:591, (1978).
14. Yalow, R.S., "Ectopic ACTH in Carcinoma of the Lung," **Progress in Cancer Research and Therapy,** eds F.M. Muggia and M. Rozencweig, Raven Press (New York), 11:209, (1979).
15. Nelson, D.H., J.W. Meakin and G.W. Thorn, "ACTH-Producing Tumors Following Adrenalectomy for Cushing's Syndrome," **Annals of Internal Medicine,** 52:560 - 569, (1960).
16. Krieger, D.T. and M. Luria "Plasma ACTH and Cortisol Responses to TRF, Vasopressin or Hypoglycemia in Cushing's Disease and Nelson's Syndrome," **The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism,** 44:361-368, (1977).
17. Tonks, D.B., "A Study of the Accuracy and Precision of Clinical Chemistry Determinations in 170 Canadian Laboratories," **Clinical Chemistry,** 9: 217, (1963).
18. Rodbard, D., et. al., "Statistical Quality Control of Radioimmunoassays," **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,** 28:1412, (1968).
19. **National Committee for Clinical Laboratory Standards,** Internal Quality Control Testing: Principles and Definitions, Approved Guideline, NCCLS document C24-A (ISBN 1-56238-112-1), NCCLS, 771 East Lancaster Avenue, Villanova, PA, 19085, (1991).

SYMBOLS USED WITH DEVICES

	English	Français	Deutsch	Español	Italiano
CE	European Conformity	Conformité aux normes européennes	CE – Konformitäts-kennzeichnung	Conformidad europea	Conformità europea
	Expiration Date	Date limite d'utilisation	Mindesthaltbar-keitsdatum	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Manufacturer	Fabricant	Hersteller	Fabricante	Fabbricante
	Consult Instructions for Use	Consulter les instructions d'utilisation	Gebrauchsanwei-sung beachten	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
IVD	In vitro diagnostic.	Diagnostic in vitro.	In-vitro-Diagnostikum.	Diagnóstico in vitro.	Diagnostica in vitro.
LOT	Lot No.	No. de lot	Chargen-Nr.	Número de lote	Lotto n°
	Temperature limitation.	Limitation de température.	Temperaturbereich	Limitación de temperatura	Limite della temperatura
SORB	Solid phase (Coated beads.)	Phase solide (Billes enduites).	Festphase (Beschichtete Kügelchen).	Fase sólida (Perlas recubiertas).	Fase solida (Perle con rivestimento).
BUF WASH 10x	Wash buffer	Tampon de lavage	Waschpuffer	Tampón de lavado	Tampone di lavaggio
Ag	Tracer: antigen labelled with ^{125}I	Traceur : antigène marqué à l'iode ^{125}	Tracer: ^{125}I-markiertes Antigen	Trazador: antígeno etiquetado con ^{125}I	Tracciatore: antigene etichettato con ^{125}I
CAL	Calibrator	Étalon	Kalibrator	Calibrador	Calibratore
CONTROL	Control serum	Sérum de contrôle	Kontrollserum	Suero de control	Siero di controllo
	Radioactive	Radioactif	Radioaktiv	Radiactivo	Radioattivo
Xn	Harmful	Nocif	Gesundheits-schädlich	Nocivo	Nocivo

SYMBOLS USED WITH DEVICES CONTINUED ON NEXT PAGE.

CONTINUED FROM PREVIOUS PAGE - SYMBOLS USED WITH DEVICES

	Português
CE	Conformidade com as normas europeias
	Prazo de validade
	Fabricante
	Consulte as instruções de utilização
IVD	Diagnóstico in vitro.
LOT	N.º do lote
	Limite de temperatura.
SORB	Fase sólida (Pérolas revestidas).
BUF WASH 10x	Tampão de lavagem
Ag	Traçador: antígeno marcado com ^{125}I
CAL	Calibrador
CONTROL	Soro de controlo
	Radioactivo
Xn	Nocivo

Distribué Par :

DiaSorin S.A.
11, rue Georges Besse
92160 Antony, France





DiaSorin Inc.
1951 Northwestern Avenue
P.O. Box 285
Stillwater, MN 55082-0285 U.S.A.

Phone: 651-439-9710
FAX: 651-779-7847

For Customer Service in the
U.S. and Canada Call Toll Free:
800-328-1482

In the United Kingdom Call:
44 118 9364200
FAX: 44 118 9792061

27238
12715 8/03

PRINTED IN U.S.A.